

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

DENISE CAROLINE DE PAIVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA ARTICULAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS
POR CHIKUNGUNYA VÍRUS.**

Uberlândia/MG

2022

DENISE CAROLINE DE PAIVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA ARTICULAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS
POR CHIKUNGUNYA VÍRUS.**

Projeto de pesquisa apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (MG) como requisito parcial para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Área de Concentração: Diagnóstico por Imagem.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Martins Fayad Milken.

Co-orientador: Me. Rafael Borges Rosa.

Uberlândia/MG

2022

RESUMO

O vírus Chikungunya é um alfavírus capaz de infectar fêmeas do mosquito da espécie *Aedes aegypti* e serem transmitidos ao homem através do mesmo. Os pacientes infectados com Chikungunya desenvolvem um quadro de artralgia que pode se agravar, tornando-se persistente por meses e promovendo fortes dores músculo esqueléticas que, em alguns casos, pode gerar uma incapacidade permanente, impedindo o paciente de desempenhar sua atividade laboral, o que resulta em um problema socioeconômico importante. Portanto, é importante elucidar os efeitos patogênicos causados por estes agentes infecciosos nas articulações, bem como desenvolver um modelo animal específico para estudos de artralgias causadas por arbovírus. O objetivo do estudo foi avaliar os achados radiográficos articulares de camundongos infectados com Chikungunya. O experimento utilizou camundongos A129WT, com sete e vinte e três dias de idade, os quais foram inoculados com as cepas virais cultivadas em laboratório pela via *footpad*, mimetizando a picada do mosquito vetor. Durante o experimento os animais foram avaliados quanto a sinais clínicos e comportamentais sugestivos de artropatia. A eutanásia dos animais foi feita cinco dias após a infecção para os animais em fase aguda e vinte e cinco dias após a infecção para os grupos em fase crônica, logo após serem radiografados. Observou-se que não houve diferença entre as radiografias dos animais infectados e dos animais do grupo controle, ou seja, nenhum dos animais apresentou sinais radiográficos sugestivos de doença articular.

Palavras-chave: Arbovírus. Alfavírus. Artralgia. Artrite Crônica. Infecção Viral.

ABSTRACT

Chikungunya virus is an alphavirus able to infect females of the *Aedes aegypti* species and to be transmitted to humans through the same mosquito. Infected patients with Chikungunya develop arthralgia, which may worsen and turn into a persistent condition for months, causing acute musculoskeletal pains. This disability may become permanent, preventing the patient from performing his or her professional activities, which results in a significant socioeconomic problem. Therefore, it is important to elucidate the pathogenic effects caused by these infectious agents in articulations, as well as develop a specific animal model for studies on arthralgia resulting from arboviruses. The objective of this study is to evaluate the radiographic articulation findings of mice infected with Chikungunya. This experiment used two groups of mice A129WT, with seven and twenty-three days of age. The mice were inoculated with the virus strains cultivated in laboratory via footpad, mimicking the vector mosquito's sting. During the experiment, the animals were evaluated regarding clinical and behavioral signs related to arthropathy. The animals' euthanasia was performed five days after the infection of the animals in the acute phase and twenty-five days after the infection in the chronic phase, immediately after they had been radiographed. There was no difference between the radiographs of the animals infected and the ones of the animals in the control group; in other words, none of the animals showed radiographic signs suggesting articulation diseases.

Keywords: Arboviruses. Alphaviruses. Arthralgia. Chronic Arthritis. Viral Infection.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1	Arboviroses	7
2.1.1	Alfavírus	8
2.1.1.1	Vírus Chikungunya	9
2.2	Fisiopatologia da Artrite Viral	10
2.3	Modelo Murino A129	11
2.4	Diagnóstico Radiográfico de Doença Articular	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Animais	16
3.2	Desenho Experimental	16
3.3	Exame Radiográfico	17
3.4	Análise estatística	18
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO	24
7	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses representam um potencial desafio para a Saúde Pública em muitos aspectos. O vírus Chikungunya (CHIKV) é um *alfavírus* assim como os vírus da Dengue e da Zika, cuja presença no Brasil e em outros países das Américas causam risco a população em geral, uma vez que todos os indivíduos parecem ser susceptíveis e que não existem métodos profiláticos ou terapêuticos eficazes, tais como vacina ou antiviral (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; FURUYA-KANAMORI et al., 2016; SERRA et al., 2016; PETERSEN; POWERS, 2016).

Acosta-Ampudia et al. (2018) destacaram que os fatores associados a surtos de arbovírus incluem: (1) modificação do ecossistema pelo homem, tais como agricultura, crescimento populacional, urbanização, migração e desmatamento; (2) adaptação do vírus a diferentes vetores por meio de mutações genéticas; (3) resistência de vetores a inseticidas e resistência de patógenos a medicamentos; e por fim, (4) mudanças climáticas desencadeando a disseminação de vetores dentro de uma nova região geográfica onde as células de defesa da população são *NAIVE*, induzindo surtos epidêmicos.

Assim como outros arbovírus, o CHIKV é capaz de infectar fêmeas da espécie *Aedes aegypti* e ser retransmitido através das mesmas, razão pela qual é possível ocorrer a co-transmissão destes vírus, ou seja, pode ser que um mesmo vetor realize a transmissão de CHIKV simultaneamente com outros tipos virais, tais como o vírus da dengue (DENV), uma vez que o vetor se encontra amplamente distribuído nas cidades brasileiras (FURUYA-KANAMORI et al., 2016; SERRA et al., 2016). Apesar da letalidade do CHIKV ser considerada baixa, trata-se de uma doença debilitante, cujas formas febris são pouco estudadas, e que podem causar doenças articulares severas, aspectos estes que demandam maior atenção (CHEN et al., 2014; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; MOTA et al., 2015).

O aparecimento de artralgia é comum nos pacientes infectados por alfavírus, e é caracterizada por uma dor persistente nas articulações dos joelhos, tornozelos, pulsos, dedos e cotovelos, podendo levar à incapacitação do indivíduo a partir do desenvolvimento de um quadro grave de poliartrite crônica (FIGUEIREDO, 2006; HONÓRIO et al., 2015). Essa afecção pode ser diagnosticada por meio de radiografia, sendo este um exame diagnóstico relativamente barato e de disponibilidade praticamente universal (MOTA et al., 2012).

Embora este seja um fato conhecido, existem poucas pesquisas descritas na literatura utilizando modelos animais que auxiliem especificamente no estudo e entendimento destas doenças articulares. Isto ocorre, pois, camundongos imunossuprimidos têm sido o modelo de escolha para estudo da Chikungunya, uma vez que estes não possuem o receptor IFN α/β , tornando-os incapazes de responder ao IFN tipo I. Condição esta, que tem feito com que estes camundongos sejam usados para caracterizar a infecção por estes vírus (DOWALL et al., 2016; ROSSI et al., 2016), no entanto, devido à ausência de resposta imunológica, estes animais não sobrevivem à infecção por tempo suficiente para desenvolver a forma crônica da doença (DOWALL et al., 2016).

Sendo assim, é de extrema relevância identificar um modelo animal que seja capaz de desenvolver um quadro de artrite crônica, decorrente da infecção pelo CHIKV, para que possamos compreender melhor a patogenia articular oriunda da doença, tanto em seu estágio agudo quanto crônico. Portanto, o objetivo com este trabalho foi verificar se a espécie estudada é capaz de desenvolver um quadro clínico de artrite e se os achados radiográficos articulares são compatíveis ou não com o quadro da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Arboviroses

As infecções virais são uma causa bem reconhecida de artralgia aguda e artrite. O diagnóstico pode ser difícil de confirmar, mas deve ser considerado em todos os pacientes que apresentarem sintomas poliarticulares de início agudo. Dentre os diversos agentes causadores desta patologia estão os vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus), e destes, dois gêneros principais estão associados à artrite aguda: alfavírus e flavivírus (MARKS; MARKS, 2016).

As arboviroses, dentre elas os *alfavírus*, ressurgiram de forma mais marcante neste século, e são transmitidas em áreas urbanas ou periurbanas por mosquitos *Aedes spp.* Todas são transmitidas em ciclos zoonóticos envolvendo primatas não humanos e mosquitos arborícolas, e entraram em ciclos de humano para humano envolvendo transmissão urbana pelo *Aedes aegypti* e, em alguns casos, *A. albopictus*. O *A. aegypti* é eficiente pois é altamente suscetível a esses vírus, alimenta-se preferencialmente de sangue de seres humanos, é ativo durante o dia, e muitas vezes pica várias pessoas em um curto período. Além disso, o aumento das viagens internacionais e a globalização aceleram a introdução dos arbovírus em novas áreas e explica sua expansão geográfica (WILDER-SMITH, 2017).

De acordo com um estudo realizado por Chaves et al. (2018), da Fiocruz Minas, é possível que um mosquito esteja coinfestado com dois tipos distintos de arboviroses, de tal forma que uma pessoa pode ser infectada com ambas a partir da picada de um único mosquito. Destaca-se que a coinfecção por mais de um arbovírus terá implicações epidemiológicas importantes, e que infecções mistas nos seres humanos poderão acarretar sintomas ainda mais complexos.

Lima-Camara (2016) afirmou que a recente entrada de novos arbovírus, associado ao surgimento de casos de coinfecção com outras arboviroses é um desafio para a Saúde Pública, tornando o diagnóstico clínico e até mesmo o tratamento desses pacientes um desafio ainda maior. Isto porque alguns testes sorológicos utilizados para detecção desses arbovírus em hospedeiros vertebrados podem apresentar reações cruzadas, dificultando o diagnóstico acurado. Dessa forma, destacou a necessidade de uma investigação ativa e contínua acerca dos sintomas, e de sorologias específicas dos vetores, dos agentes etiológicos e dos fatores

ambientais e sociais que podem estar associados às epidemias e ao surgimento de novos casos.

Teich, Arinelli, Fahham (2017) ressaltaram que os impactos econômicos e sociais das arboviroses para o Brasil são consideráveis, pois além do quadro clínico negativo para o paciente, os custos totais relacionados ao manejo do vetor, tratamento dos doentes, entre outros, representaram, juntos, aproximadamente 2% do orçamento previsto para a saúde, em 2016. Embora a maioria dos pacientes apresentem recuperação completa após a fase aguda da doença, há registros de que alguns sintomas podem se prolongar, interferindo nas atividades laborais, podendo inclusive culminar em incapacidades permanentes. Nestes casos, o impacto socioeconômico é preocupante, com prejuízos em torno de R\$431 milhões só em 2016, devido à perda de produtividade por consequência das arboviroses.

2.1.1 Alfavírus

O gênero alfavírus foi descrito no International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV) como sendo um vírus RNA, geralmente transmitido por mosquitos (MARKS; MARKS, 2016). O período de incubação de todos os alfavírus varia de 3 a 15 dias e as epidemias são bem reconhecidas. Zaid et al. (2020) descreveram que os ciclos naturais dos alfavírus são mantidos por meio de mosquitos vetores e hospedeiros vertebrados, os quais podem ser humanos, primatas não humanos, equídeos, pássaros e roedores, bem como anfíbios e répteis.

São considerados alfavírus, o vírus do Rio Ross, vírus da Floresta Barmah, vírus O'nyong-nyong, grupo do vírus Sindbis, MAYV e CHIKV, os quais, geralmente, são geograficamente restritos e causam infecções com sintomas articulares bastante predominantes (TIWARI; BERGMAN, 2021). No entanto, ainda que a distribuição geográfica seja restringida por hospedeiros e reservatórios de vetores, os surtos de CHIKV mostram o potencial de os alfavírus se espalharem substancialmente. Além disso, após o isolamento e identificação de arbovírus artritogênicos na década de 1950, incluindo CHIKV, vírus O'nyong-nyong na África e vírus Mayaro na América do Sul, surtos cíclicos e recorrentes permitiram a expansão geográfica desses vírus e seus vetores. Destaca-se que os mosquitos *Aedes spp* foram identificados como os principais vetores de transmissão dos alfavírus artritogênicos. Dentre eles *Aedes*

aegypti e *Aedes albopictus*, bem como mosquitos *Hemagogus spp*, têm demonstrado capacidade de transmitir CHIKV (ZAID et al., 2020).

Infecções humanas com alfavírus raramente foram fatais, porém as manifestações clínicas variam de doença febril leve com erupção cutânea a doença artrítica grave e debilitante, podendo evoluir para uma doença crônica, capaz de se prolongar por até 12 meses (ZAID et al., 2020). Plante et al. (2015) afirmaram que não há vacina ou tratamento aprovado para os alfavírus atualmente, e que os pacientes recebem apenas tratamento suporte e drogas anti-inflamatórias não esteroides visando aliviar parte da dor artrálgica e o inchaço nas articulações.

2.1.1.1 Vírus Chikungunya

O CHIKV é um patógeno transmitido por mosquitos, principalmente pelo *Aedes aegypti*, responsável por causar a febre chikungunya. Pertencente ao gênero *alfavírus* da família *Togaviridae*, foi isolado pela primeira vez em 1952 na África, no entanto, foi a partir de 2005 que a doença passou a ser mais estudada, devido às epidemias devastadoras dentro e ao redor do Oceano Índico. O ciclo de transmissão do vírus requer infecção de mosquitos fêmeas após picar um hospedeiro vertebrado suscetível, seguido de um período de incubação extrínseca para posterior transmissão a outro hospedeiro vertebrado durante alimentação subsequente (THIBERVILLE et al., 2013).

As manifestações clínicas observadas em pacientes com febre de chikungunya são bastante variáveis devido a capacidade de reprodução do vírus em diferentes tecidos corporais, que vão do tegumento até o sistema nervoso central, passando pelo músculo cardíaco, articulações, fígado, entre outros. O quadro clínico clássico consiste em febre alta, exantema e artralgia, afetando principalmente as pequenas e grandes articulações, podendo evoluir para uma fase subaguda com intensificação das artralgias. Já os casos clínicos atípicos incluem alterações neurológicas, cardíacas, renais e oculares, sendo mais frequentes em indivíduos acima de 65 anos e com comorbidades (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015).

Pacientes infectados com o CHIKV, podem desenvolver artrite e em casos crônicos, essa pode se comportar de forma semelhante à artrite reumatoide (AR). Nas articulações acometidas a inflamação óssea desencadeia a ativação da reabsorção óssea mediada por osteoclasto (OC) e inibe a formação óssea pelos osteoblastos

(OBs), levando a perda óssea periarticular em ossos adjacentes às articulações inflamadas e a erosões ósseas focais, podendo, ao longo do tempo, se tornar sistêmica e afetar o esqueleto apendicular e axial, aumentando o risco de fraturas. Dessa forma, surgem lesões radioluscentes, sugestivas de erosões ósseas, em pacientes com CHIKV (CHEN, 2014; WALSH; GRAVALLESE, 2010). Thiberville et al. (2013) relataram que, após o período de incubação, a maioria dos pacientes infectados sofre de poliartralgia e mialgia impactando na qualidade de vida, sendo que, após o estágio agudo, alguns pacientes tiveram recidiva caracterizada por artralgia persistente e dores musculoesqueléticas.

2.2 Fisiopatologia da Artrite Viral

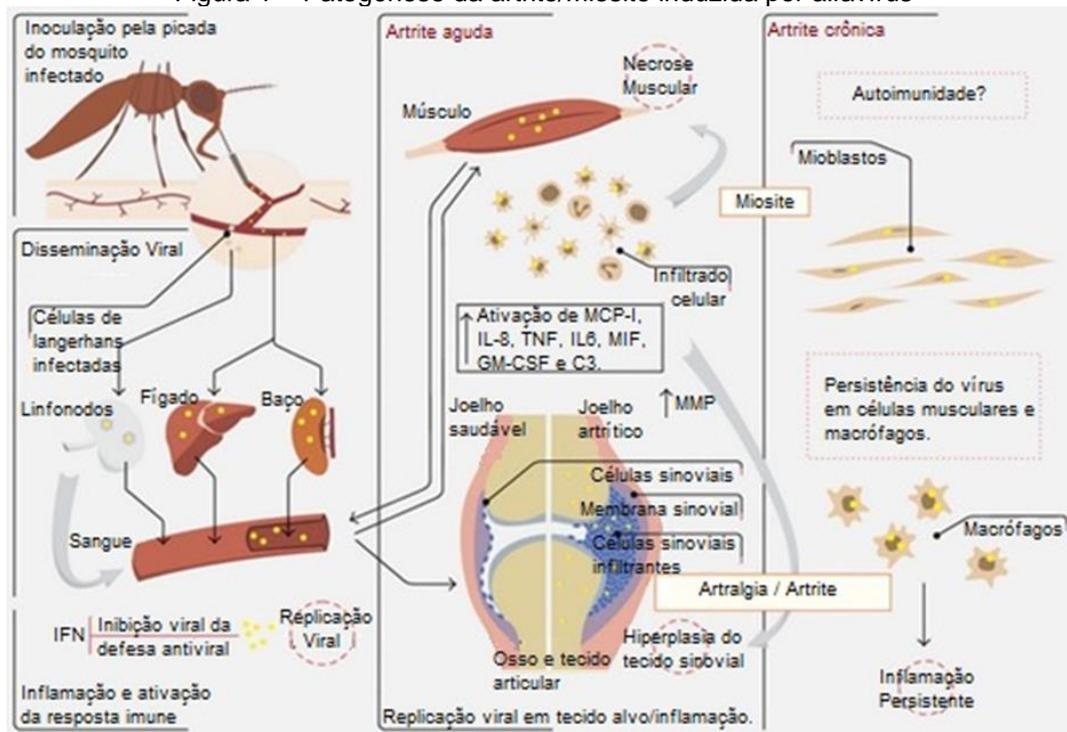
Tiwari e Bergman (2021) destacaram que na maioria dos pacientes com artrite viral, os mecanismos de ação são pouco compreendidos e que os vírus podem iniciar sintomas articulares por vias diferentes. As quais incluem invasão direta da articulação, formação de complexos imunes e modulação imune causando inflamação crônica. Segundo Assunção-Miranda, Cruz-Oliveira e Poian (2013), a gravidade da doença e a persistência dos sintomas estão associadas à extensão da replicação do vírus e à presença de mediadores inflamatórios no plasma de pacientes.

Os vírus apresentam predileção pela sinóvia articular, podendo recrutar células inflamatórias para as articulações e resultar na indução da cascata de inflamação. Em casos relacionados aos alfavírus, acredita-se que os macrófagos infectados na sinóvia sejam responsáveis por grande parte da patologia e inflamação através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases de matriz. Os quais podem transferir ainda mais esses vírus para as células residentes, como os fibroblastos sinoviais, que, por sua vez, continuam o ciclo de inflamação (TIWARI; BERGMAN, 2021). Assunção-Miranda, Cruz-Oliveira e Poian (2013) comentaram que algumas citocinas secretadas durante a infecção por alfavírus são as mesmas associadas à progressão da artrite reumatoide (AR), embora a inflamação nesta última seja associada a um processo autoimune, o que não foi comprovado na artrite induzida por alfavírus.

A Figura 1 ilustra um modelo de patogênese para artrite/miosite induzida por alfavírus. Após a inoculação, através da picada de um mosquito infectado, na pele, os alfavírus se disseminam no organismo hospedeiro pela corrente sanguínea. Fígado,

baço, músculo e linfonodos são locais de replicação primária, permitindo uma disseminação eficiente do vírus. As células de Langerhans facilitam a entrega do vírus aos linfonodos. A via do interferon (IFN) é ativada precocemente, mas os alfavírus desenvolveram vários mecanismos para inibir essa resposta antiviral. A fase aguda da doença envolve a replicação do vírus seguida de uma resposta inflamatória nos tecidos-alvo, caracterizada por uma extensa infiltração de linfócitos, células NK, neutrófilos e macrófagos, sendo este último o principal componente. O aumento dos níveis de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no local da infecção e no plasma está associado à miosite e artralgia/artrite. Além disso, a secreção de metaloproteinases (MMP) no tecido articular pode contribuir para o dano articular. A persistência dos sintomas pode estar relacionada à persistência do vírus ou de seus produtos nas células-alvo com o subsequente acúmulo de mediadores inflamatórios como IL-6 e GM-CSF (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; POIAN, 2013).

Figura 1 – Patogênese da artrite/miosite induzida por alfavírus



Fonte: Adaptado de Assunção-Miranda, Cruz-Oliveira e Poian (2013).

2.3 Modelo Murino A129

Camundongos da linhagem A129 INF^{-/-} têm sido utilizados, tanto para pesquisar a patogenia da infecção quanto para realizar testes vacinais, uma vez que

esses animais não possuem o receptor para IFN- α / β (interferon tipo I) e, portanto, são mais susceptíveis ao desenvolvimento da infecção, muitas vezes letal (Campos et al., 2020; Tun et al., 2020; Zhang et al., 2019). Para Dowall et al. (2017), os modelos de camundongos selvagens deficientes na via do interferon são excelentes modelos para estudos virais pela sua capacidade de desenvolver o fenótipo da doença. Os animais A129 desafiados com alfavírus apresentaram rápida perda de peso a partir do terceiro dia pós-desafio, aumento gradual da temperatura corporal até o quarto dia seguido de uma rápida diminuição, bem como manifestaram sinais clínicos próprios da doença no quinto dia, os quais foram aumentando até que os desfechos humanos fossem atingidos no sexto dia pós-desafio (DOWALL et al., 2016).

Isso ocorre pois a fase aguda da infecção promove a ativação da imunidade inata, com intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas IFN- α / β , visando combater a propagação, replicação e disseminação viral (VENUGOPALAN, GHORPADE, CHOPRA, 2014), razão pela qual camundongos com a via IFN tipo I totalmente inativada são incapazes de se defender da doença e desenvolvem uma infecção grave, com tropismo tecidual correspondente aos sintomas observados em humanos, ou seja, o CHIKV pode ser recuperado dos músculos esqueléticos, articulações e pele (COUDERC *et al.*, 2009). É importante compreender que a resposta imune do hospedeiro e, em especial, a produção de IFN, é desencadeada pela ativação de receptores denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os quais têm um papel essencial no início da imunidade inata pois detectam patógenos invasores através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais podem ser glicoproteínas de superfície, RNA de fita simples (ssRNA) ou RNA de fita dupla (dsRNA) e DNA CpG não metilado (SCHILTE C., *et al.*, 2010).

Camundongos A129, embora não tenham um sistema imunológico totalmente competente, uma vez que são deficientes em IFN- α / β , podem ser adequados para avaliar terapêuticas antivirais e vacinas (PLANTE et al., 2015). Além disso, uma vez que os modelos animais precisam ser consistentes e capazes de se reproduzir em laboratório, com o mínimo de alterações necessárias para replicar a doença natural, o camundongo A129 em conjunto com cepas naturais continua sendo um modelo valioso para o estudo da infecção (DOWALL et al., 2017).

No que se refere a modelos de camundongos do tipo selvagem (WT), Couderc et al. (2009) demonstram que os neonatos são suscetíveis ao CHIKV e que a

gravidade da doença neonatal é dependente da idade. É importante destacar que os alfavírus são capazes de se replicar em ossos de camundongos e promover perda óssea com uma fisiopatologia semelhante à que ocorre em pacientes humanos. Imagens obtidas a partir de tomografia microcomputadorizada permitiram identificar a reabsorção óssea anormalmente alta que contribui para erosões articulares e perda óssea sistêmica, ambos presentes na AR, como já havia sido citado (CHEN, 2014; CHEN, 2015).

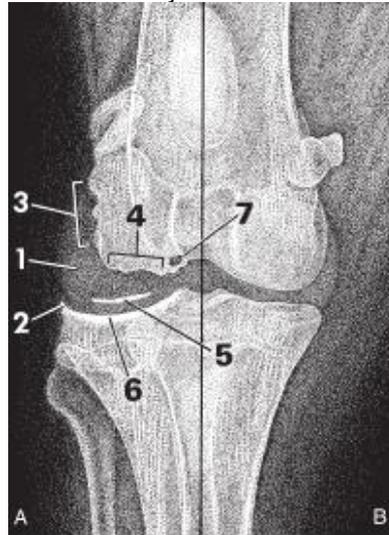
2.4 Diagnóstico Radiográfico de Doença Articular

Mota et al. (2012) afirmaram que a radiologia convencional, seja ela analógica ou digital, é o exame de triagem da artrite reumatoide, sendo indispensável para todos os pacientes uma vez que as alterações radiográficas fazem parte dos critérios diagnósticos da doença. Vale ressaltar que a modalidade digital apresenta inúmeras vantagens em relação à analógica, dentre elas redução do custo com suprimentos descartáveis e eliminação da manutenção da câmara escura, otimização de contraste e latitude de exposição, possibilidade de pós-processamento de imagem, devido a capacidade de ajustar a escuridão e o contraste da imagem após a exposição, melhor acessibilidade à imagem e armazenamento consolidado e portabilidade aprimorada facilitando a consulta (THRALL, 2019, p. 29).

Segundo Thrall (2019, p.403), a maioria dos sinais radiográficos de doença articular são inespecíficos e incluem: aumento do volume sinovial, compressão do coxim gorduroso infrapatelar, alteração na espessura do espaço articular, diminuição ou aumento da radiopacidade do osso subcondral, formação de cisto ósseo subcondral, alteração da radiopacidade do osso pericondral, proliferação óssea pericondral, mineralização de tecido mole articular, corpos calcificados intra-articulares, deslocamento ou incongruência da articulação, malformação da articulação e gás intra-articular.

A Figura 2 ilustra algumas das alterações que podem ser encontradas numa articulação doente em comparação com uma articulação saudável de cães. Além disso, ressalta-se que a doença articular progressiva pode apresentar sinais distintos quando avaliada em estágios diferentes. Portanto, conhecer a fisiopatologia da doença e correlacionar com os achados radiográficos das articulações é primordial para o diagnóstico de doenças articulares.

Figura 2 – Ilustração comparando as alterações radiográficas de doença articular com uma articulação saudável.



A - Sinais radiográficos de doença articular em cão, observar o aumento da massa sinovial (1), osteófito pericondral (2) e formação de entesófito (3), que são alterações radiográficas comuns. Já a erosão da superfície óssea subcondral (4) e fragmento mineralizado livre na articulação (5) são menos comuns, enquanto o aumento da opacidade óssea subcondral (6) e a formação de cisto ósseo subcondral (7) são sinais de doença articular crônica. B - Articulação normal. Fonte: Thrall (2019).

A radiografia simples é vantajosa pelo seu custo-benefício e pelo fácil acesso ao exame, no entanto é relativamente insensível nos estágios iniciais da artrite (FONSECA, 2020). Em humanos, o comprometimento articular crônico causado por alfavírus, caracteriza-se pela presença de oligo ou poliartralgia de intensidade variável, geralmente simétrica, predominante em punhos, mãos, tornozelos e joelhos, em associação com rigidez matinal e edema articular em humanos (MARQUES et al., 2017).

Nesta fase da doença o exame radiográfico simples deve ser solicitado tanto para avaliação estrutural inicial, como para acompanhar a progressão da doença, e maior parte dos achados radiográficos, foram verificados em imagens obtidas entre três meses e dois anos de doença, sendo estes: aumento de partes moles, calcificações, erosões, esclerose subcondral, osteófitos, osteopenia periarticular, reação periosteal e redução de espaço articular (MARQUES et al., 2017). Destaca-se ainda que ratos com artrite induzida por adjuvante, eutanasiados 30 dias pós infecção, apresentaram edema dos tecidos moles associado a estreitamento dos espaços articulares, além de reabsorção da matriz óssea, neoformação periosteal e erosão óssea, o que implica em destruição óssea decorrente da condição artrítica

(EKAMBARAM; PERUMAL; SUBRAMANIAN, 2010; CAI et al., 2006), evidenciando a importância do exame radiográfico para compreensão das alterações articulares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O experimento com animais foi desenvolvido de acordo com a legislação e as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e conforme a regulamentação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que aprovou a realização do mesmo em 10 de setembro de 2021, sob o protocolo nº 029/20. Foram utilizados 24 camundongos A129WT, machos e fêmeas, com idade de 7 e 23 dias de vida, pesando de 2 a 10 gramas, obtidos e mantidos pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU).

3.2 Desenho Experimental

O experimento utilizou grupos de animais em diferentes faixas etárias, sendo 7 e 23 dias de vida. Cada grupo de mesma faixa etária foi então dividido em 4 grupos e distribuídos de forma aleatória, sendo 2 grupos experimentais, contendo 4 animais cada, um agudo e outro crônico, e 2 grupos controle, contendo 2 animais cada, um agudo e outro crônico (Quadro 1). Cada grupo foi colocado separadamente em gaiolas coletivas, com água e ração “*ad libitum*”.

Quadro 1 – Total de animais divididos por grupo experimental, sexo e faixa etária.

		QUANTIDADE DE ANIMAIS POR SEXO E IDADE								SUB TOTAL
		PBS - AGUDO		CHIKV - AGUDO		PBS - CRÔNICO		CHIKV - CRÔNICO		
		M	F	M	F	M	F	M	F	
IDADE	7 dias	1	1	2	2	1	1	2	2	12
	23 dias	1	1	2	2	1	1	2	2	12
TOTAL DE ANIMAIS										24

Os animais do grupo experimental foram infectados pelo CHIKV, enquanto os grupos de controle foram inoculados com solução PBS, todos pela via *footpad*, mimetizando a picada do mosquito vetor. A dose inoculada foi de 20µl para os animais de 23 dias, sendo 10µl em cada membro pélvico, e 10µl para os animais de 7 dias de vida, sendo feito apenas no membro pélvico direito. A concentração da alíquota viral foi de 1x10⁴/ml. Feita a inoculação, os grupos de animais na fase aguda foram

eutanasiados 5 dias pós infecção (dpi) e os grupos na fase crônica com 25 dias pós infecção.

Nos dias que seguiram entre a inoculação e a eutanásia os animais foram observados diariamente quanto às suas condições físicas e comportamentais, buscando por sinais que sugerissem o desenvolvimento de artropatia, tais como: dor, rubor, aumento de volume e/ou perda de função dos membros afetados. A escala de graduação sugerida foi: 0 (zero) – animais hígidos, sem nenhum sinal clínico; 1 (um) – animais que apresentaram aumento de volume e vermelhidão nas patas; 2 (dois) – animais que apresentaram todos os sinais do grupo 1, somados à dor; 3 (três) – animais que apresentaram todos os sinais do grupo 2, somados à perda de função do membro.

A eutanásia foi realizada por aprofundamento anestésico, seguido de deslocamento cervical. Para isso, os animais foram inoculados com cetamina na dose de 300mg/kg + xilazina na dose de 30mg/kg por via intraperitoneal. Após a ausência de reflexo de endireitamento e ausência de reflexo doloroso ao pinçamento coccígeo, foi realizado o deslocamento cervical. Isso foi feito com auxílio de uma pinça anatômica que foi posicionada na região cervical, imediatamente posterior ao osso occipital, a base da cauda foi firmemente segurada com a outra mão e, com apenas um movimento preciso, a pinça anatômica foi deslocada cranialmente enquanto a base da cauda deverá manter o animal imóvel.

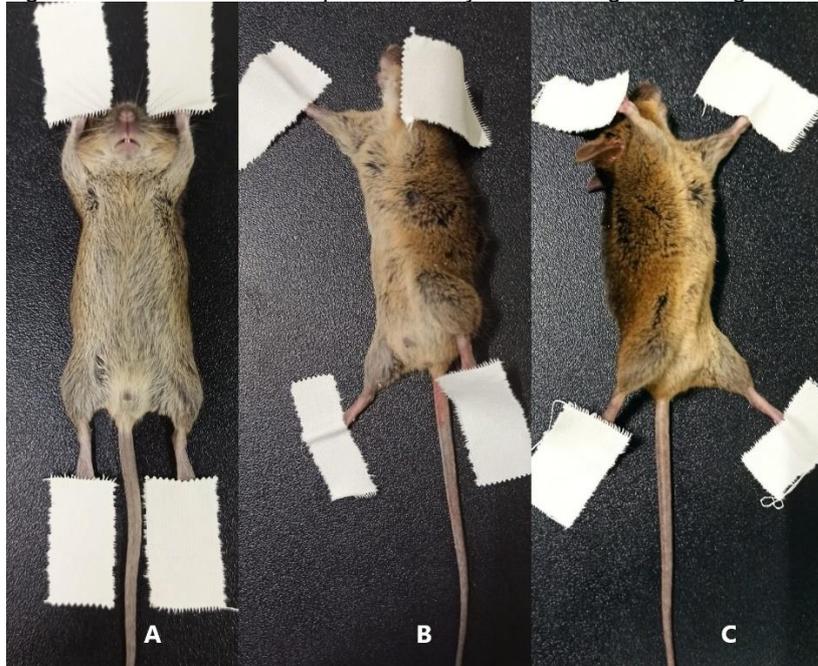
3.3 Exame Radiográfico

Após a eutanásia, os animais foram encaminhados para o Serviço de Radiologia Veterinária do Hospital Veterinário da UFU para realização das imagens radiográficas das articulações. O aparelho de raios-x utilizado foi o Medicor NEO-DIAGNOMAX, modelo RS-3, 150kV, 500mA.

Para o exame radiográfico, foi definido o foco fino em 100%, a kilovoltagem e miliamperagem foram calculadas a partir da espessura das articulações e os valores definidos foram: 160mAs, 42mA, 4 segundos e 25kV. As articulações radiografadas foram umerorradioulnar, carpometacarpal, femurotibiopatelar e tibiotársica e os animais foram posicionados pela técnica *handsfree* (com auxílio de esparadrapo) diretamente no cassete, em decúbito lateral e dorsal, para projeções radiográficas craniocaudal de membros pélvicos e caudocranial de membros torácicos, bem como

projeção mediolateral de cada membro (Figura 3) (THRALL, 2019, p. 334). As imagens obtidas foram digitalizadas em processadora CR-10x AFGA e posteriormente foram arquivadas em formato DICOM para análise e descrição dos achados radiográficos.

Figura 3 - Posicionamento para realização das imagens radiográficas.



A – Decúbito dorsal para realização das projeções caudocranial de membros torácicos e craniocaudal de membros pélvicos. B – Posicionamento lateral para realização da projeção mediolateral direita de membros torácicos e pélvicos. C – Posicionamento lateral para realização da projeção mediolateral esquerda de membros torácicos e pélvicos.

3.4 Análise estatística

Os diagnósticos radiográficos foram avaliados por meio de tabelas de contingência 2x2 (BERQUÓ, SOUZA, GOTLIEB, 1981), confeccionada a partir dos cálculos de sensibilidade e especificidade dos métodos, sendo:

Sensibilidade: detecção dos verdadeiramente positivos.

$$\text{Sensibilidade: } \frac{\text{verdadeiros positivos (VP)}}{\text{verdadeiros positivos (VP) + falsos negativos (FN)}} \times 100$$

Especificidade: detecção dos verdadeiramente negativos.

$$\text{Especificidade: } \frac{\text{verdadeiros negativos (VN)}}{\text{verdadeiros negativos (VN) + falsos positivos (FP)}} \times 100$$

Para a presente pesquisa, foram considerados verdadeiramente positivos os animais que apresentarem alterações compatíveis com artralguas, e como verdadeiramente negativos aqueles cujas articulações estavam íntegras, utilizando como parâmetro comparativo o grupo controle.

4 RESULTADOS

Durante todo o experimento, nenhum dos animais, seja grupo controle ou infectado, apresentou sinais clínicos sugestivos de artrite, ou seja, todos os animais foram classificados como pertencentes ao grupo 0 (zero), na escala de sinais clínicos estipulada. Ou seja, os animais não apresentaram sinais sugestivos de dor, rubor e ou edema, assim como não claudicaram nem manifestaram comportamento de compensação de quaisquer dos membros, e dessa forma deambulavam normalmente.

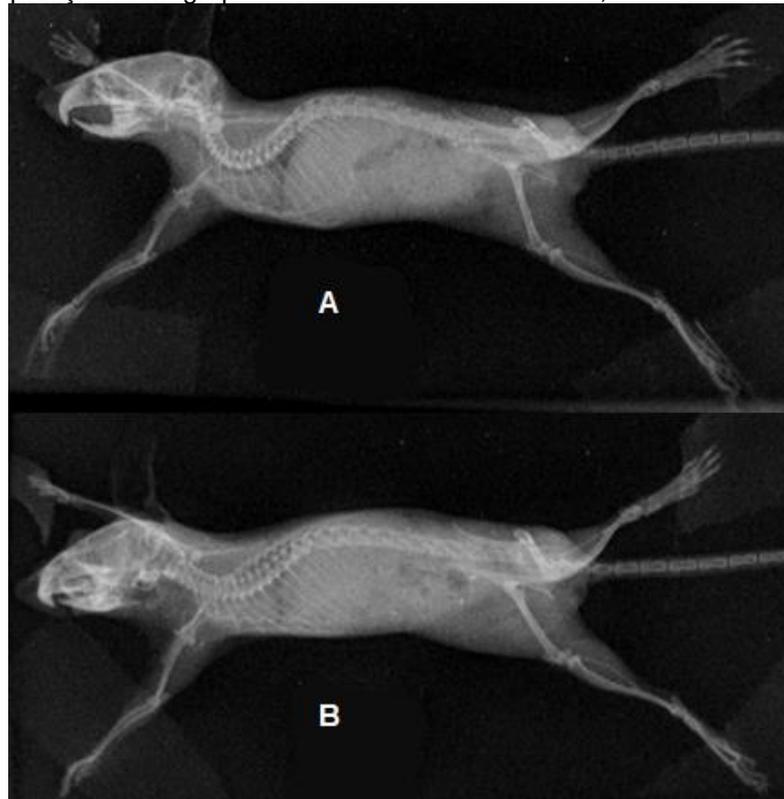
Radiograficamente, as articulações avaliadas foram articulação umerorradioulnar, carpometacarpal, femurotibiopatelar e tibiotársica. Observou-se que tanto os grupos controle quanto os grupos de animais inoculados com o vírus, apresentaram ausência do aumento de tecidos moles, contorno ósseo e superfície articular preservados, bem como presença da linha de crescimento regular e inalterada (Figuras 05, 06 e 07). Ou seja, não houve diferença entre as radiografias dos animais infectados e dos animais que receberam PBS.

Figura 05 – Comparação entre grupo controle e infectado crônicos, inoculados aos 23 dias de idade.



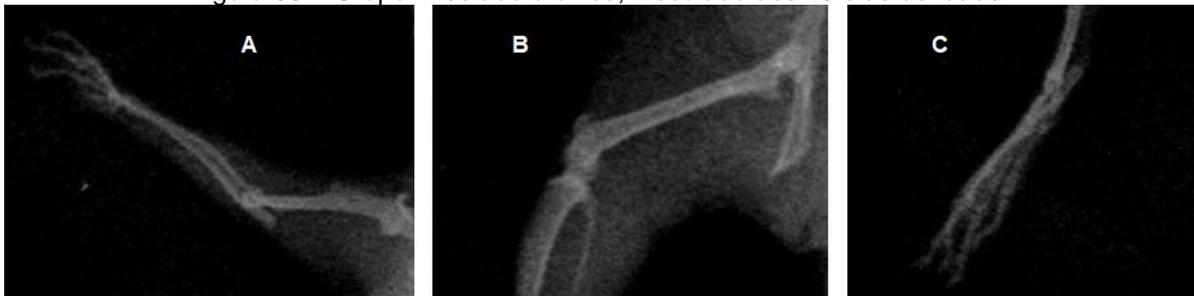
A – Imagem radiográfica para avaliação de membros torácicos na projeção caudocranial e pélvicos na projeção craniocaudal, em camundongo inoculado com PBS. B – Imagem radiográfica para avaliação de membros torácicos na projeção caudocranial e pélvicos na projeção craniocaudal, em camundongo inoculado com CHIKV.

Figura 06 – Comparação entre grupo controle e infectado crônicos, inoculados aos 7 dias de idade.



A – Imagem radiográfica para avaliação de membros torácico e pélvico direito na projeção mediolateral, em camundongo inoculado com PBS. B – Imagem radiográfica para avaliação de membros torácico e pélvico direito na projeção mediolateral, em camundongo inoculado com CHIKV.

Figura 08 – Grupo infectado crônico, inoculado aos 23 dias de idade.



A – Imagem radiográfica aproximada de membro torácico direito na projeção mediolateral, em camundongo inoculado com CHIKV. B – Imagem radiográfica aproximada de articulação femurotibioapatelar direita na projeção mediolateral, em camundongo inoculado com CHIKV. C – Imagem radiográfica aproximada de articulação metatarsofalangeana direita na projeção mediolateral, em camundongo inoculado com CHIKV.

5 DISCUSSÃO

Camundongos são modelos animais de grande importância para estudos de diversas patologias, incluindo as infecções por Chikungunya vírus (COUDERC et al., 2008). No entanto, os modelos testados até o presente momento não se mostraram capazes de desenvolver a fase crônica da infecção, uma vez que morrem ainda na fase aguda da doença (DOWALL et al., 2016), impossibilitando o estudo dos mecanismos envolvidos na patologia articular crônica causada pela infecção pelo CHIKV (CHOW et al., 2011).

Embora não sobrevivam por muitos dias após a infecção, uma das espécies mais utilizadas em pesquisas relacionadas ao CHIKV é o A129 IFN $-/-$, deficiente no receptor interferon, por esta razão, optou-se por utilizar o A129 WT, o qual é imunocompetente e, portanto, capaz de combater a infecção viral. Um estudo anterior, utilizando camundongos C57BL/6 WT fêmeas, com 6 semanas de idade, evidenciou a presença de infiltrado inflamatório nas articulações, bem como aumento de volume nos pés dos animais infectados, caracterizando uma artrite aguda (GARDNER et al., 2010). Em outro experimento realizado com C57BL/6, Chang et al. (2021) observou que os animais apresentaram inchaço na região de tarso na fase aguda, recuperando-se totalmente cerca de 7 dpi. Sendo assim, nossa hipótese era que, por serem imunocompetentes, os camundongos A129 WT desenvolveriam a doença, mas não morreriam em decorrência da infecção ao serem inoculados com uma carga viral alta, possibilitando que o quadro evoluísse para uma artrite crônica. Destaca-se que, embora camundongos C57BL/6 tenham sido bastante citados, em nenhum experimento a infecção decorreu até a fase crônica, razão pela qual optamos por testar uma espécie diferente.

Nos animais infectados esperava-se encontrar sinais radiográficos compatíveis com efusão sinovial, aumento ou redução do espaço articular, presença de osteófito e/ou entesófito, osteólise do osso subcondral, esclerose e/ou aumento de tecidos moles (THRALL, 2019), tais como ilustrado na Figura 2. No entanto, nenhum destes sinais foi observado em quaisquer um dos grupos experimentais, resultado este que, somado à ausência de sinais clínicos, sugerem que os animais não desenvolveram a doença e, portanto, estavam saudáveis.

Um estudo anterior demonstrou que camundongos WT são resistentes à infecção e não apresentam nenhum sinal de morbidade (COUDERC et al., 2008),

corroborando com os resultados encontrados em nosso experimento. No entanto, este mesmo experimento aponta que neonatos WT, inoculados aos 6 dias, se mostraram susceptíveis, desenvolvendo sinais clínicos graves e evoluindo para o óbito 12 dpi, contrariando os resultados encontrados em nosso experimento, uma vez que os neonatos sobreviveram até o final do experimento sem nenhum sintoma clínico.

Para este experimento, o A129WT foi um fator limitante, pois são animais hígdos e com um sistema imunológico que se mostrou eficiente em combater a infecção pelo CHIKV. Por esta razão, os animais não desenvolveram a doença, impossibilitando a avaliação dos achados radiográficos decorrentes desta. Outra limitação do estudo foi a ausência de análise histopatológica das articulações, exame que poderia confirmar a ausência de alterações articulares e conferir maior confiabilidade aos resultados clínicos e radiográficos.

Para estudos futuros algumas alternativas podem ser testadas, tais como ensaios com neonatos ainda mais jovens, cuja imunidade inata ainda é ineficiente, ou realizar testes com animais A129 IFN $-/-$, visando estabelecer a menor dose infecciosa possível para que os animais desenvolvam a infecção, porém não morram num curto espaço de tempo, permitindo que a doença siga seu curso e evolua para uma infecção crônica, tornando possível a ocorrência da doença artrítica e sua avaliação radiográfica. Além disso, é importante que seja realizada a análise histopatológica das articulações para auxiliar no diagnóstico da artrite e fundamentar melhor o estudo.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se, a partir dos resultados obtidos, que camundongos A129WT não desenvolveram sinais clínicos compatíveis com infecção articular após inoculação intradérmica do CHIKV e, portanto, não foi possível determinar quais achados radiográficos poderiam ser visualizados se estes animais apresentassem a doença.

7 REFERÊNCIAS

- ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al. **Mayaro: an emerging viral threat?**. *Emerging microbes & infections*, v. 7, n.1, p. 163, 26 Sep. 2018.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I; CRUZ-OLIVEIRA, C; DA POIAN, A, T. **Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis**. *Biomed Res Int*, v. 2013, Não paginado, Aug. 2013.
- AZEVEDO, R. S. S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. **Chikungunya risk for Brazil**. *Revista de Saúde Pública [online]*, v. 49, n. 00, p. 1-6, 2015.
- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. 2a edição. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 1981, 350 p.
- CAI, X. et al. **The comparative study of Sprague–Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis**. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 373, n. 2, p. 140–147, 2006.
- CAMPOS, R. K. et al. **Adenoviral-Vectored Mayaro and Chikungunya Virus Vaccine Candidates Afford Partial Cross-Protection From Lethal Challenge in A129 Mouse Model**. *Front. Immunol., Sec. Vaccines and Molecular Therapeutics*, 04 November 2020.
- CHAVES, B. A. et al. **Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host**. *The Journal of infectious diseases*, v. 218, n. 4, p. 563-571, 2018.
- CHANG. A. Y. et al. **A Mouse Model for Studying Post-Acute Arthritis of Chikungunya**. *Microorganisms* 9, 1998; (2021).
- CHEN W, et al. **Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss**. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 111, n. 16, Não paginado, Apr. 2014.
- CHEN W, et al. **Bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein synthesis, protects against bone loss induced by chikungunya virus infection**. *J Virol*, v. 89, n. 1, Não paginado, Jan. 2015.
- CHOW, A. et al. **Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor**. *Chikungunya Pathology and Cytokines d. JID* 2011:203 (15 January).
- COUDERC, T. et al. **A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease**. *PLoS Pathogens*, 4(2):e29. Open Access, Freely Available Online, 2008.
- COUDERC, Thérèse et al. **Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection**. *Journal of Infectious Diseases*, v. 200, n. 4, p. 516-523, 2009.
- DOWALL, S. D. et al. **A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 5, Não paginado, May. 2016.
- DOWALL, S. D. et al. **Lineage-dependent differences in the disease progression of Zika virus infection in type-I interferon receptor knockout (A129) mice**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, Não paginado, Jul. 2017.
- EKAMBARAM, S.; PERUMAL, S. S.; SUBRAMANIAN, V. **Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model**. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 10, n. 1, Não paginado, Oct. 2010.
- FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. **Febres hemorrágicas por vírus no Brasil**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online]*. v. 39, n. 2, p. 203-210, Abr. 2006.

- FIGUEIREDO, Maria L. G. de; FIGUEIREDO, Luiz T. M. **Emerging alfavíruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro**. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, [s. l.], p. 677-683, Dez. 2014.
- FONSECA, Adriana Rodrigues. **Artrite Aguda em Crianças e Adolescentes**. Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento Científico de Reumatologia, v. 2019-2021, n. 12, Não paginado, Nov. 2020.
- FURUYA-KANAMORI, L. et al. **Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses**. BMC Infect. Dis. v. 16, n. 84, Não paginado, Mar. 2016.
- GARDNER, J. et al. **Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice**. JOURNAL OF VIROLOGY, Aug. 2010, p. 8021–8032.
- HONÓRIO, Nildimar A. et al. **Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil**. Cadernos de Saúde Pública [online]. v. 31, n. 5, p. 906-908, May. 2015.
- International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV). **Virus Taxonomy**. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae/alphavirus>.
- LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. **Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil**. Rev Saúde Pública;50:36, (2016).
- MARKS, M.; MARKS, J. L. **Viral arthritis**. Clinical Medicine, v. 16, n. 2, p. 129–134, 2016.
- MARQUES, Claudia D. L. et al. **Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever**. Part 1 - Diagnosis and special situations. Revista Brasileira de Reumatologia [online]. v. 57, n. 2, p. 421-437, 2017.
- MOTA, Licia M. H. da et al. **Diagnóstico por imagem da artrite reumatóide inicial**. Revista Brasileira de Reumatologia. v. 52, n. 5, p. 761-766, 2012.
- MOTA, Mânlio T. de O. et al. **Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas**. Future Medicine, [s. l.], Não paginado, Sep. 2015.
- PETERSEN, Lyle R.; POWERS, Ann M. **Chikungunya: Epidemiology**. F1000 Research, [s. l.], Não paginado, Jan. 2016.
- PLANTE, K. S. et al. **Extended Preclinical Safety, Efficacy and Stability Testing of a Live-attenuated Chikungunya Vaccine Candidate**. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 9, Não paginado, 2015.
- ROSSI, S. L. et al. **Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 94, n. 6, p. 1362–1369, 2016.
- SCHILTE C., et al. **Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells**. J. Exp. Med. 2010; 207:429–42.
- SERRA, O. P. et al. **Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, [s. l.], p. 20-29, Jan. 2016.
- TEICH, V., ARINELLI, R., FAHHAM, L. **Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil**. J Bras Econ Saúde; 9(3): p. 267-276, (2017).
- THIBERVILLE, Simon-Djamel et al. **Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy**. Antiviral Research, [s. l.], p. 345-370, Set. 2013.
- THRALL, Donald E. **Veterinary Diagnostic Radiology**. 7 ed. Missouri: Elsevier, 2019, 998 p.

TIWARI Vivekanand, BERGMAN, Marty J. **Viral Arthritis**. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), [s. l.], Não paginado, Jul. 2021.

TUN, M. M. N. et al. **Pathogenetic Potential Relating to Metabolic Activity in a Mouse Model of Infection with the Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype**. *Viruses* 2020, 12(2), 169; 3 February 2020.

VENUGOPALAN, A., GHORPADE, R. P., CHOPRA, A. **Cytokines in acute Chikungunya**. *PLoS One*, v.9, n.10, p. e111305, 2014.

WALSH, N., GRAVALLESE, L. **Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance**. *Immunological Reviews*, Vol. 233: p. 301–312, (2010).

WILDER-SMITH, Annelies et al. **Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health**. *The Lancet infectious diseases*, v. 17, n. 3, p 101-106, 2017.

Z Aid, A. et al. **Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses**. *The Lancet Infectious Diseases*, [s. l.], Não paginado, 2020.

ZHANG, H. L. et al. **Visualization of chikungunya virus infection in vitro and in vivo**. *Emerging Microbes & Infections*, Volume 8, 2019 - Issue 1.