

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia

Gabrielly Carvalho de Mattos

**ANEXINA A1 ATENUA ALTERAÇÕES NO PERFIL DE FIBROBLASTOS
SINOVIAIS INDUZIDAS PELA INFECÇÃO DO VÍRUS *CHIKUNGUNYA***

Belo Horizonte

2023

Gabrielly Carvalho de Mattos

**ANEXINA A1 ATENUA ALTERAÇÕES NO PERFIL DE FIBROBLASTOS
SINOVIAIS INDUZIDAS PELA INFECÇÃO DO VÍRUS *CHIKUNGUNYA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Flávio Almeida Amaral

Belo Horizonte

2023

043

Mattos, Gabrielly Carvalho de.

Anexina A1 atenua alterações no perfil de fibroblastos sinoviais induzidas pela infecção do vírus Chikungunya [manuscrito] / Gabrielly Carvalho de Mattos. – 2023.

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

Orientador: Flávio Almeida Amaral.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Fibroblastos. 4. Artrite. 5. Ligante RANK. 6. Anexinas. I. Amaral, Flávio Almeida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



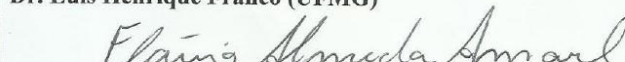
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE GABRIELLY CARVALHO DE MATTOS. Aos dezesseis dias do mês de outubro de 2023 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Anexina A1 atenua alterações no perfil de fibroblastos sinoviais induzidas pela infecção do vírus Chikungunya", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Almeida Amaral, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Danielle da Glória de Souza (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luís Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de outubro de 2023.


 Dra. Danielle da Glória de Souza (UFMG)


 Dr. Luís Henrique Franco (UFMG)


 Dr. Flávio Almeida Amaral - Orientador (UFMG)

RESUMO

O vírus *Chikungunya* (CHIKV) causa uma doença artritogênica e demonstra tropismo por fibroblastos sinoviais (FLS), células que contribuem para a inflamação, dor e degradação da cartilagem e osso. Considerando a ausência de medicamentos ou vacinas específicas para o CHIKV, o direcionamento de FLS como alvo para tratamento pode compor uma abordagem terapêutica promissora. A anexina A1 (ANXA1) é uma proteína com potentes efeitos pró-resolutivos e analgésicos, atuando no reestabelecimento da funcionalidade tecidual. Portanto, este trabalho objetiva explorar os componentes da articulação tibiofemoral durante a infecção pelo CHIKV e avaliar o impacto da ANXA1 sob esse ambiente. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6 (selvagens) ou BALB/c (selvagens e deficientes para ANXA1) com 4 semanas, infectados com inóculo de 10^6 PFU de CHIKV na pata. Os grupos de animais C57BL/6 foram tratados com Ac2-26 (150 µg/camundongo via i.p. ou 10 µM/camundongo via i.a.) e o tecido sinovial tibiofemoral de animais C57BL/6 foi coletado para início de cultura primária de FLS. No 3º dia pós-infecção (d.p.i.), camundongos BALB/c deficientes para ANXA1 e infectados demonstraram hiperplasia mais severa no tecido sinovial tibiofemoral em relação a camundongos infectados BALB/c do tipo selvagem, conforme indicado por escores histopatológicos. Em camundongos C57BL/6 infectados, houve um aumento em quantidade da subpopulação de FLS CD90-FAP+ no tecido sinovial, embora todas as populações de FLS analisadas apresentarem aumento na expressão de RANKL após a infecção. Em contraste, animais infectados e tratados com Ac2-26 por via i.p., iniciado uma hora antes da infecção até o 6º d.p.i., tiveram uma redução do número de FLS, bem como menor expressão de RANKL, perfil semelhante ao de animais não infectados. Quanto ao tratamento com Ac2-26 por via i.a., recebido 3 horas pós-infecção (h.p.i.) e no 3º d.p.i., foi possível identificar menor resposta nociceptiva até o 3º d.p.i. para animais tratados, em relação a animais não tratados. Por fim, a infecção *in vitro* de FLS promoveu um aumento da citocina IL-6 detectada em sobrenadante, bem como uma diminuição de viabilidade celular, ao passo que o tratamento *in vitro* com o peptídeo Ac2-26 foi capaz de diminuir os níveis da citocina em 12 e 48 h.p.i., em relação a poços infectados e não tratados. Em conclusão, o estudo destaca que FLS são ativados durante a infecção pelo CHIKV *in vivo* e *in vitro* e que a ANXA1 e o Ac2-26 são capazes de controlar essa atividade, sugerindo

uma alternativa para o controle da inflamação e da disfunção tecidual causada pelo CHIKV.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya, fibroblastos, artrite, ligante RANK, anexinas.

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) causes an arthritogenic disease and exhibits a tropism for synovial fibroblasts (FLS), which are cells that contribute to the development of inflammatory arthritis, leading to pain and promoting the degradation of cartilage and bone. Considering the absence of CHIKV-specific drugs or vaccines, targeting synovial fibroblasts may be considered a therapeutic approach. Annexin A1 (ANXA1) is a protein with potent pro-resolving and analgesic effects, acting to reestablish tissue functionality. Hence, this work aims to explore the tibiofemoral joint during CHIKV infection and to assess the potential impact of ANXA1 on this process. To achieve this, C57BL/6 (wild-type) or BALB/c (wild-type and ANXA1-deficient) mice at 4 weeks of age were infected with an inoculum of 10^6 PFU of CHIKV in the paw. The C57BL/6 animal groups were treated with Ac2-26 (150 μ g/mouse via i.p. or 10 μ M/mouse via i.a.), and the tibiofemoral synovial tissue from C57BL/6 animals was collected to initiate primary culture of FLS. On the 3rd day post-infection (d.p.i.), ANXA1-deficient BALB/c mice infected with CHIKV exhibited more severe hyperplasia in the tibiofemoral synovial tissue compared to wild-type BALB/c infected mice, as indicated by histopathological scores. In infected C57BL/6 mice, there was an increase in the CD90-FAP⁺ FLS subpopulation in the synovial tissue, although all FLS populations analyzed showed increased RANKL expression after infection. In contrast, infected animals treated with Ac2-26 via i.p., initiated one hour before infection until the 6th d.p.i., had a reduction in the number of FLS as well as lower RANKL expression, resembling the profile of uninfected animals. Regarding treatment with Ac2-26 via i.a., administered at 3 hours post-infection (h.p.i.) and on the 3rd d.p.i., it was possible to identify a reduced nociceptive response until the 3rd d.p.i. in treated animals compared to untreated ones. Lastly, *in vitro* infection of FLS led to an increase in the cytokine IL-6 detected in the supernatant, as well as a decrease in cell viability, whereas *in vitro* treatment with the Ac2-26 peptide was able to decrease cytokine levels at 12 and 48 h.p.i. compared to infected and untreated wells. In conclusion, this study highlights that FLS are activated during CHIKV infection both *in vivo* and *in vitro*, and ANXA1 and Ac2-26 can control this activity, suggesting an alternative approach for controlling inflammation and tissue dysfunction caused by CHIKV.

Keywords: *Chikungunya virus*, fibroblasts, arthritis, RANK ligand, annexins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura conformacional do CHIKV.....	13
Figura 2. Ciclo de replicação viral.	14
Figura 3. Distribuição global do CHIKV.....	18
Figura 4. Sintomas da febre Chikungunya.	19
Figura 5. Imunopatogênese do CHIKV.....	21
Figura 6. Arquitetura articular saudável.....	27
Figura 7. Ampla funcionalidade de FLS.	30
Figura 8. ANXA1 e Ac2-26.	34
Figura 9. Ações pró-resolutivas da ANXA1.	35
Figura 10. Delineamento experimental.....	43
Figura 11. Estratégia experimental de tratamento da infecção pelo CHIKV com peptídeo Ac2-26.	45
Figura 12. Papel da ANXA1 sob a arquitetura articular sinovial em contexto de infecção pelo CHIKV.	54
Figura 13. Impacto do tratamento por via de administração sistêmica com Ac2-26 no modelo animal de infecção pelo CHIKV em processos inflamatórios e nociceptivos.	56
Figura 14. Estratégia de <i>gates</i>	57
Figura 15. Efeito do tratamento com Ac2-26 em modelo de via de administração sistêmica sob a hiperplasia celular sinovial e expressão do ligante RANKL por FLS associado ao modelo animal de infecção por CHIKV.....	59
Figura 16. Modulação do perfil Inflamatório e nociceptivo por Ac2-26 em modelo de tratamento por via de administração local para animais infectados pelo CHIKV.....	61
Figura 17. Dinâmica de viabilidade celular e produção de IL-6 em cultura primária de FLS infectada pelo CHIKV ao longo do tempo.	63
Figura 18. Efeito do tratamento com Ac2-26 nos níveis de IL-6 do sobrenadante celular de cultura primária de FLS infectada pelo CHIKV.	64
Figura 19. Efeito do tratamento com Ac2-26 diretamente sob a infecção pelo CHIKV em cultura primária de FLS.	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINEs: Anti-inflamatórios não esteróides

ANXA1: Anexina A1

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio

BSA: Albumina sérica bovina

cAMP: Monofosfato cíclico de adenosina

CCL(): Quimiocina CC Ligante ()

CD90: Cluster de diferenciação 90

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHIKV: *Chikungunya virus*

COX-2: Ciclo-oxigenase-2

DENV: *Dengue virus*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

D.P.I.: Dias pós-infecção

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

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

FAP: Proteína de ativação de fibroblastos

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

FLS: Fibroblastos sinoviais

FPRs: Receptores de formil peptídeos

g: Força G

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

gRNA: RNA genômico

H&E: Hematoxilina e Eosina

i.a.: Intra-articular

i.d.: Intradérmica

IFN-(): Interferon-()

Ig() – Imunoglobulina ()

IL-(): Interleucina-()

i.p.: Intraperitoneal

Kb: Quilobase

MAYV: *Mayaro virus*

MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos 1

MDA5: Gene 5 associado à diferenciação do melanoma

MEC: Matriz extracelular

nsP1-4: Proteínas não estruturais 1-4

OMS: Organização Mundial da Saúde

ONNV: *O'nyong'nyong virus*

OPG: Osteoprotegerina

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

PFU: *Plaque Forming Unit* - Unidade formadora de placa

PLA2: Fosfolipase A2

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RANKL: Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B

RIG-I: *Retinoic acid-inducible gene* - gene I induzível pelo ácido retinóico

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Rotação por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SFB: Soro fetal bovino

TNF: Fator de necrose tumoral

TGF- β : Fator de crescimento transformador-beta

TLR(): *Toll-like-receptor* () – receptor do tipo toll ()

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

ZIKV: *Zika virus*

WT: *wild type* – fenótipo selvagem

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	<i>Chikungunya virus</i>	12
1.1.1.	Estrutura e organização	13
1.1.2.	Ciclos de transmissão	15
1.1.3.	Epidemiologia.....	16
1.1.4.	Febre Chikungunya	18
1.1.5.	Patogênese	20
1.1.6.	Diagnóstico, tratamentos e prevenção	24
1.2.	Fibroblastos sinoviais	27
1.2.1.	Morfologia e subpopulações	28
1.2.2.	Função	29
1.3.	Controle da inflamação	31
1.3.1.	Anexina A1	32
1.3.2.	Estrutura e localização	32
1.3.3.	Interação com receptor e cascata de sinalização	34
1.3.4.	Funções	35
1.3.5.	Participação da ANXA1 em doenças artritogênicas	37
2.	OBJETIVOS.....	40
2.1.	Objetivo geral	40
2.2.	Objetivos específicos	40
3.	MÉTODOS	41
3.1	Animais	41
3.2	Vírus.....	41
3.3	Fármaco	42
3.4	Modelo experimental <i>in vivo</i>	43
3.5	Hipernocicepção mecânica	45

3.6	Citometria de fluxo	46
3.7	ELISA	47
3.8	Análise histopatológica.....	48
3.9	Cultura primária de FLS	49
3.10	Modelo experimental <i>in vitro</i>	49
3.11	Ensaio MTT	50
3.12	Análise por RT-qPCR.....	51
3.13	Análise estatística	51
4.	RESULTADOS.....	53
4.1.	A ausência de ANXA1 provoca maior hiperplasia na camada íntima da membrana sinovial da articulação tibiofemoral de animais infectados pelo CHIKV. 53	
4.2.	Ac2-26 em estratégia de tratamento por administração sistêmica reduz parâmetro inflamatório plantar, apesar de não reverter quadro de hipernocicepção associado à infecção pelo CHIKV.	55
4.3.	Ac2-26 em estratégia de tratamento por via de administração sistêmica demonstra participação no controle da hiperplasia celular sinovial e expressão do ligante RANKL por FLS em camundongos infectados pelo CHIKV.....	56
4.4.	Ac2-26 em estratégia de tratamento por via de administração local influencia perfil nociceptivo e inflamatório de animais infectados pelo CHIKV.	59
4.5.	Infecção de cultura primária de FLS pelo vírus CHIKV tem MOI ótimo de 0,1 para resposta inflamatória e viabilidade celular.....	61
4.6.	Modulação do tratamento <i>in vitro</i> com Ac2-26 sob a resposta inflamatória em FLS infectados pelo CHIKV mostra-se concentração e tempo dependentes. ...	63
4.7.	Tratamento <i>in vitro</i> com Ac2-26 em cultura primária de FLS infectada pelo CHIKV não demonstra interferir na carga viral.	64
5.	DISCUSSÃO	66
6.	CONCLUSÃO	73
7.	REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são microrganismos que desempenham um papel significativo na história da saúde pública global. Esses organismos acelulares replicam-se exclusivamente no interior de células hospedeiras e, além de demonstrarem funções significativas no contexto ecológico e evolutivo, podem provocar prejuízos à saúde do hospedeiro. Um dos exemplos mais recentes e impactantes reflete a infecção pelo vírus SARS-CoV-2, que resultou na pandemia de COVID-19, marcada por mais de seis milhões de mortes, grandes impactos no sistema de saúde, aspectos socioeconômicos e na qualidade de vida de indivíduos infectados (WHO, 2023).

Os arbovírus representam um grupo diverso de vírus transmitidos por vetores artrópodes, que provocam grande impacto na morbidade e mortalidade da população humana. As principais famílias virais deste grupo, que causam doenças humanas, incluem Togaviridae (gênero *Alphavirus*) e Flaviviridae (gênero *Flavivirus*), formadas por vírus envelopados e de RNA em fita simples e sentido positivo, representados, por exemplo, pelo *Chikungunya vírus* (CHIKV) e *Dengue virus* (DENV) respectivamente. Nas últimas décadas a emergência desses vírus vêm sendo expressiva, destacando a importância e também os desafios que permeiam o controle de transmissão, tratamento e compreensão da fisiopatologia associadas ao processo infeccioso (Young, 2018).

1.1. *Chikungunya virus*

A família Togaviridae é composta por dois gêneros, *Alphavirus* e *Rubivirus*. Os *Alphavirus* assumem uma posição de destaque entre os patógenos transmitidos por artrópodes, constituindo um grupo de significativa relevância médica. Esses agentes virais podem ser categorizados de forma abrangente de acordo com suas características patogênicas. Encontramos *Alphavirus* de natureza artrítogênica, tais como o CHIKV, o *Mayaro virus* (MAYV) e o *O'nyong'nyong vírus* (ONNV), os quais são associados à indução de sintomas articulares. Em contraste, há *Alphavirus* de caráter encefálico, exemplificados pelo Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e o Vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), que se correlacionam com a ocorrência de encefalite em indivíduos afetados (Powers *et al.*, 2001).

O CHIKV detém posição de destaque como *Alphavirus* mais amplamente disseminado entre os seres humanos, com transmissão através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, além de ser considerado para inclusão em 2018 na lista restrita da Organização Mundial da Saúde (OMS) destinada a pesquisas prioritárias e desenvolvimento, a qual notavelmente incluiu o coronavírus pandêmico (WHO, 2018).

1.1.1. Estrutura e organização

Com um diâmetro de 65 nm, o CHIKV exibe uma estrutura de partícula viral esférica. Trata-se de um vírus de RNA fita simples de sentido positivo, cujo material genético é encapsulado pelo capsídeo viral e circundado por uma membrana originada da célula hospedeira. Nessa membrana, estão acomodadas as proteínas do envelope viral, que constituem a camada externa glicoproteica em simetria icosaédrica, como evidenciado na Figura 1. Tal organização exibe uma elevada simetria e eficiência, sendo propícia para o empacotamento do material genético, além de facilitar interações com células hospedeiras (Voss *et al.*, 2010; Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

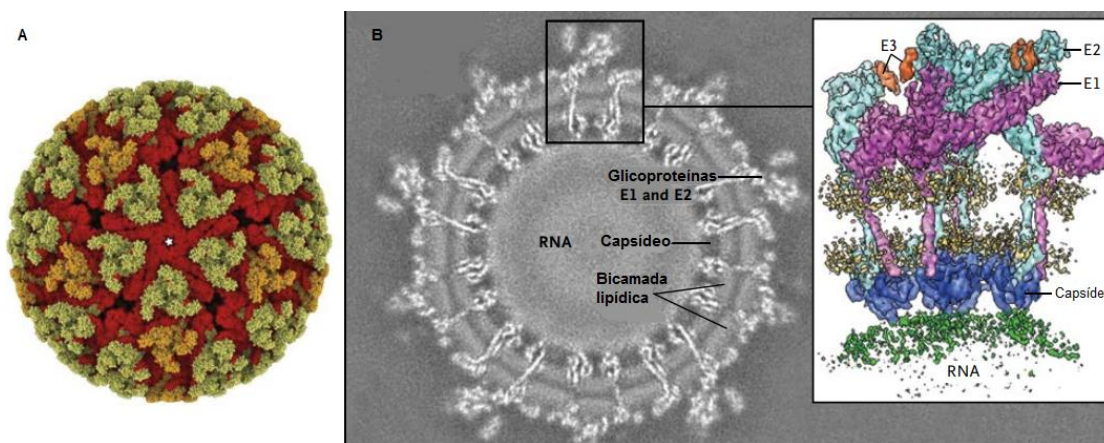


Figura 1. Estrutura conformacional do CHIKV.

(A) Forma tridimensional do vírion. **(B)** Reconstrução por microscopia crioelétrica de alta resolução do CHIKV, destacando organização do capsídeo e bicamada lipídica, além de localização do RNA e glicoproteínas de superfície em estrutura prevista. Adaptado de Weaver & Lecuit, 2015.

O RNA genômico (gRNA), com um tamanho de aproximadamente 12 kb, apresenta duas sequências de leitura aberta. Essas sequências codificam duas poliproteínas que, após serem clivadas, resultam na formação de proteínas não

estruturais (nsP1-4) e proteínas estruturais (C-E3-E2-6K/TF-E1), que estão envolvidas com os ciclos de multiplicação viral, esquematizado na Figura 2 (Schwartz & Albert, 2010).

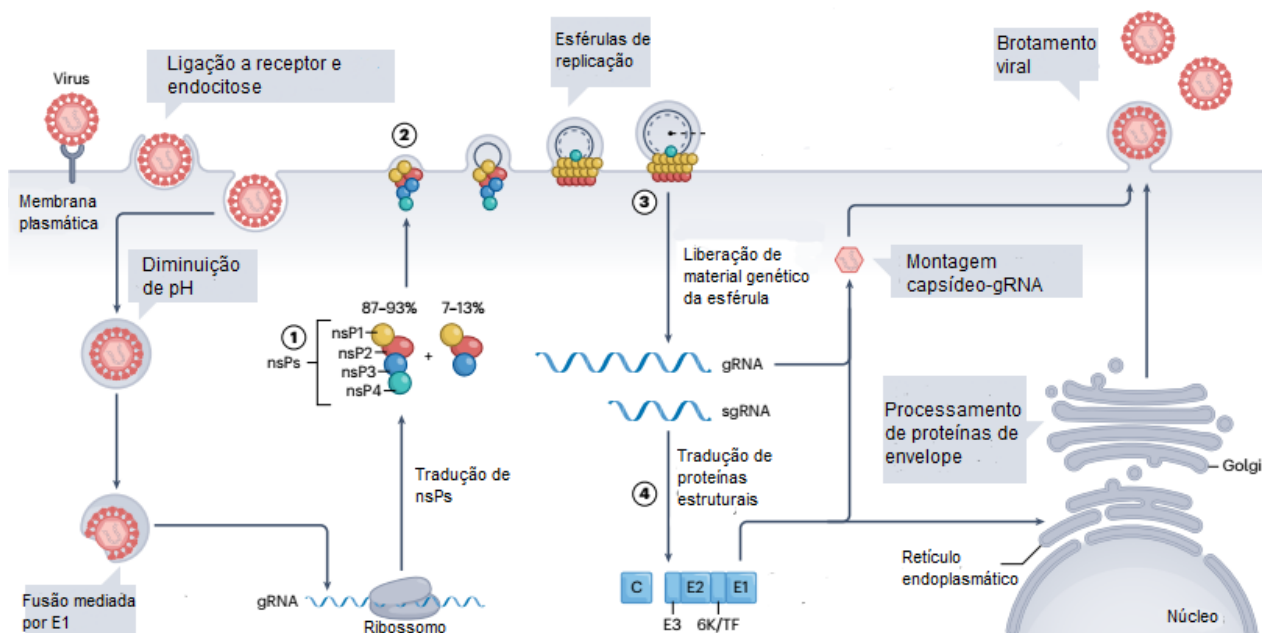


Figura 2. Ciclo de replicação viral.

Resumo esquemático de etapas de replicação do CHIKV, com indicação numérica das fases de replicação genômica. Adaptado de Bartholomeeusen *et al.*, 2023.

Para a multiplicação viral, o CHIKV faz uso de processos de endocitose mediada por clatrina, após interação com moléculas presentes na membrana do hospedeiro, como integrinas, receptores fosfatidilserina (TIM1/TIM4/AXL), DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) e MXRA8 (Kim *et al.*, 2022). Essa molécula de adesão, MXRA8, tem sido reconhecida como um mediador de entrada para diversos *Alphavirus* artritogênicos emergentes. Além disso, é expressa em larga escala, desempenhando um papel crucial no apoio à infecção em vários tipos celulares, incluindo fibroblastos sinoviais, osteoblastos, condrócitos e células musculares esqueléticas (Zhang *et al.*, 2018; Basore *et al.*, 2019).

Seguido à endocitose, o ambiente ácido do endossoma desencadeia mudanças conformacionais no envelope viral, que levam à exposição da proteína E1, mediadora da fusão de membranas entre vírus e célula hospedeira

(Bartholomeeussen *et al.*, 2023). Assim, com essa fusão, o gRNA é liberado no citoplasma celular hospedeiro e passa por tradução de sequências de nsP1-4, que formam o complexo de replicação. Essas nsPs desempenham papéis específicos: nsP1 está envolvida na síntese da fita negativa do RNA viral; nsP2 exibe atividades como RNA helicase, RNA trifosfatase e proteinase, enquanto também participa do desligamento da transcrição na célula hospedeira; nsP3 faz parte da unidade replicase; e nsP4 assume a função de RNA polimerase viral (Bartholomeeussen *et al.*, 2023; Schwartz & Albert, 2010). Em sequência, ocorre a translocação do complexo de replicação formado para a membrana plasmática do hospedeiro, dando origem às esférulas de replicação. Nestes compartimentos, as nsPs atuam na produção de gRNA e RNAs subgenômicos (sgRNA), posteriormente liberados no citosol. O RNA subgenômico, de modo geral, orienta a expressão da poliproteína estrutural, que dará origem após clivagem à proteína E1, a qual demonstra o papel de fusão de membranas, à proteína E2 com função de ligação a receptores, E3 que evita a liberação e ligação prematura durante a montagem do vírus, e à proteína 6K/TF, que funciona como um canal iônico no retículo endoplasmático, para estimular a liberação eficiente das partículas virais (Yaw *et al.*, 2022; Bartholomeeussen *et al.*, 2023). A partir de clivagem autoproteolítica o capsídeo é formado, enquanto que as proteínas de envelope são processadas na membrana do retículo endoplasmático e subsequentemente amadurecem no complexo de Golgi. Por fim, a montagem viral é induzida pela ligação do capsídeo a sequências específicas do gRNA, o que promove o recrutamento das glicoproteínas de envelope, que se organizam e passam a compor a partícula viral, liberada da membrana celular pelo processo de brotamento (Yaw *et al.*, 2022; Bartholomeeussen *et al.*, 2023; Schwartz & Albert, 2010).

1.1.2. Ciclos de transmissão

O CHIKV é transmitido a humanos através da picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes*. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito ingere o vírus, o qual, então, infecta diversas partes do inseto, incluindo as glândulas salivares. Posteriormente, durante um subsequente repasto sanguíneo, o vírus é introduzido na pele do hospedeiro, o que resulta na sua infecção e sustentação do ciclo de replicação viral (Bartholomeeussen *et al.*, 2023). Essa fase de infecção vetorial denota um estágio extrínseco do ciclo infeccioso, durante o qual o agente viral é

adquirido pelo inseto vetor e é subsequente à incubação do vírus em um hospedeiro vertebrado, o que caracteriza a fase intrínseca do processo (Stelitano *et al.*, 2019).

A transmissão viral pode ser categorizada em dois padrões distintos, um ciclo enzoótico e outro ciclo urbano. No ciclo enzoótico, também chamado de ciclo silvático, mosquitos que habitam regiões florestais desempenham um papel essencial. Eles predominantemente transmitem o vírus para primatas não humanos, que servem como reservatórios do CHIKV e, ocasionalmente, também podem infectar hospedeiros humanos. Por outro lado, o ciclo urbano é caracterizado por espécies de mosquitos adaptadas a áreas urbanas, onde ocorre a transmissão do vírus para os seres humanos (Azar *et al.*, 2020). A transmissão mais frequente está ligada a populações de mosquitos *Aedes aegypti*, que ocorrem principalmente em áreas periurbanas ou urbanas, em ciclos urbanos. No entanto, ao longo das últimas décadas, o mosquito *Aedes albopictus*, originalmente considerado zoofílico e de habitat silvestre, tem ganhado destaque como vetor do CHIKV, desempenhando um papel crescente na sua transmissão (Kolimenakis *et al.*, 2021). Ademais, transmissão vertical também pode ser identificada durante a infecção pelo CHIKV, com risco de ocorrência de $\geq 15\%$, aumentada quando a infecção acontece durante o período intraparto (Contopoulos-Ioannidis *et al.*, 2018; Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

1.1.3. Epidemiologia

O surgimento de surtos urbanos de febre Chikungunya decorreu-se de eventos de *spillover*, nos quais a infecção se propagou para humanos a partir de ciclos de transmissão enzoótica na África (Weaver & Lecuit, 2015). Em 1952, durante um surto ocorrido na atual Tanzânia, houve o isolamento do CHIKV a partir do soro de um paciente infectado, marcando o primeiro registro desse vírus (Ross, 1956). O termo "chikungunya" foi então originado como um descritivo linguístico, originário da população Makonde, usado para caracterizar a doença e traduzível como "doença que causa dobra nas articulações" (Ross, 1956). Surtos de febre Chikungunya foram posteriormente identificados na Ásia durante as décadas de 1950 e 1960, explicado por eventos de globalização, mudanças climáticas favoráveis à propagação do vetor, maior urbanização e mutações adaptativas virais. Hoje, o CHIKV apresenta uma distribuição para além dos trópicos e neotrópicos, sendo

relatado em mais de 60 países na África, Ásia, Europa e Américas, como indicado na Figura 3 (Weaver & Lecuit, 2015).

Do ponto de vista filogenético podem ser identificadas três linhagens distintas do CHIKV correspondentes às suas respectivas origens geográficas: oeste africana (WA), leste-centro-sul africana (ECSA) e asiática. Em 2004-2006, a partir de surtos de grande magnitude da cepa ECSA, particularmente em La Réunion, decorrentes de seu alcance às ilhas do Oceano Índico, houve a emergência da linhagem do Oceano Índico (IOL), que subsequentemente se propagou para Ásia e Europa Mediterrânea (de Lima Cavalcanti *et al.*, 2022). Nas Américas, em dezembro de 2013, pequenos surtos da infecção causados pelo CHIKV foram documentados. Esses surtos foram desencadeados pela propagação da linhagem asiática do vírus até o Caribe, a partir do qual se disseminou afetando países no continente sul-americano. Como resultado, em 2015 uma estimativa apontou para aproximadamente um milhão de casos de infecção pelo CHIKV no continente, além de transmissão autóctone confirmada em mais de 50 territórios. (de Oliveira, E. C. *et al.*, 2021).

O Brasil foi o primeiro país das Américas no qual a linhagem ECSA foi relatada e hoje é a cepa mais prevalente no local (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Além disso, no território os surtos de CHIKV foram agravados pela circulação concomitante de outros arbovírus, como *Dengue virus* (DENV) e *Zika virus* (ZIKV), quando muitos pacientes apresentaram infecção dupla (Weaver & Lecuit, 2015). De acordo com o ministério da saúde brasileiro, nos três primeiros meses de 2023 os casos de febre Chikungunya mais do que dobraram em relação ao mesmo período de 2022 e o número de casos prováveis em 2023 já ultrapassou o limite máximo esperado, o que foi considerado uma série histórica de casos da doença (Ministério da saúde, 2023).

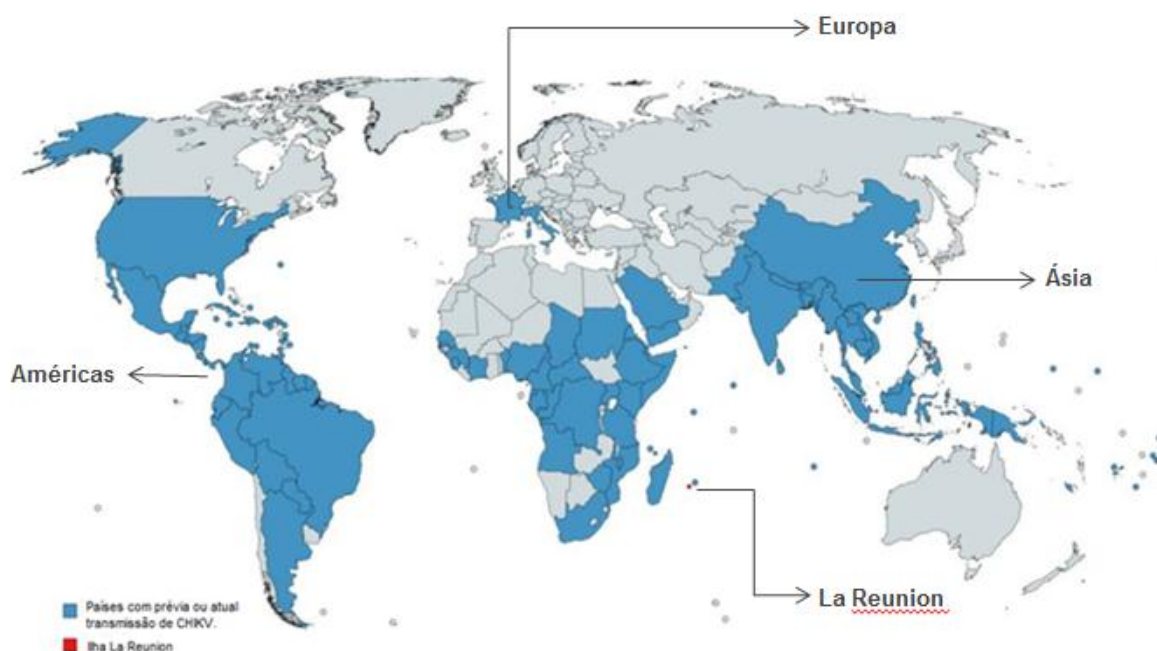


Figura 3. Distribuição global do CHIKV.

Dados referentes ao ano de 2022, que destacam países nos quais já foram identificados casos de infecção pelo CHIKV em azul e, em vermelho, marcada a Ilha *La Reunion*, local do grande surto de febre Chikungunya em 2005-2006. Adaptado de Lima Cavalcanti *et al.*, 2022.

1.1.4. Febre Chikungunya

A infecção causada pelo CHIKV exibe uma considerável variabilidade em sua apresentação clínica. Cerca de 30% dos indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos, enquanto outros desenvolvem sintomatologia característica da febre Chikungunya. Semelhante ao padrão observado em outras doenças transmitidas por arbovírus, a febre Chikungunya demonstra uma ampla variação quanto à gravidade fisiopatológica. Isso se traduz na possibilidade de manifestações clínicas desde formas leves e autolimitadas, até casos mais severos e debilitantes, que podem perdurar por períodos prolongados, como ilustrado na Figura 4 (Cunha & Trinta *et al.*, 2017; Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

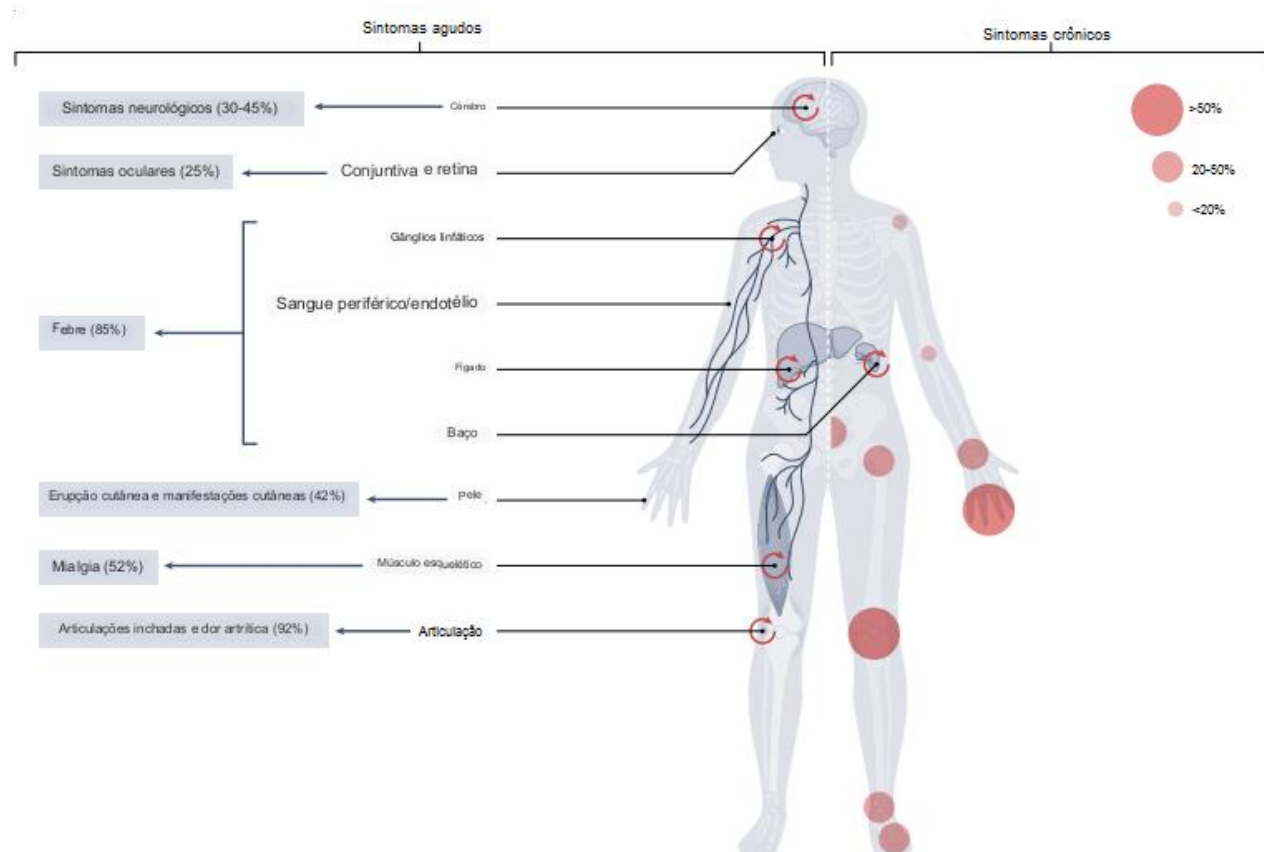


Figura 4. Sintomas da febre Chikungunya.

Esquema sintetiza sintomas apresentados durante infecção sintomática aguda e crônica pelo CHIKV. Durante fase aguda diversos sítios podem ser acometidos, sendo majoritários quadros febris, dores articulares e manifestações cutâneas, enquanto que em fase crônica os sintomas concentram-se na esfera das articulações. Adaptado de Bartholomeeusen *et al.*, 2023.

Após um período de incubação que varia de 3 a 7 dias, durante a fase aguda da doença, os pacientes predominantemente apresentam febre alta, artralgia e erupção cutânea, que constituem a tríade clínica característica da febre Chikungunya (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Outros sintomas correlacionados incluem cefaleia, fadiga, náusea, vômito, complicações gastrointestinais, miocardite, fotofobia e uveíte. Além disso, são observadas manifestações neurológicas, tais como encefalopatia, associadas a casos mais graves da doença, o que demanda internação em unidades de terapia intensiva e, em alguns casos, resulta em óbito (Amaral *et al.*, 2023; Bartholomeeusen *et al.*, 2023; Thérèse Couderc & Marc Lecuit, 2020).

Além disso, os sintomas apresentados podem exibir semelhanças com aqueles associados à dengue clássica. Observam-se ainda semelhanças quanto à

trombocitopenia, linfopenia e hipocalcemia entre essas arboviroses, porém de forma menos severa no contexto da febre Chikungunya. O fator que exerce uma alta sugestão em direção ao diagnóstico de CHIKV é a presença de artralgia intensa, frequentemente manifestada em simetria nas articulações distais (Burt *et al.*, 2017; Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Quando os sintomas artritogênicos persistem por mais de três meses é caracterizada a fase crônica da doença. No que se refere à imunopatogênese e às manifestações clínicas, essa artrite crônica decorrente da infecção pelo CHIKV é frequentemente comparada à artrite reumatoide. A sua ocorrência depende da idade do paciente e do genótipo do CHIKV, além de fatores como quadros de osteoartrite subjacentes, associados a um maior risco de desenvolvimento de fase crônica (Amaral *et al.*, 2023; Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

Embora a taxa de mortalidade seja reduzida, aproximando-se de 0,1%, e mais de metade dos pacientes relatarem a resolução dos sintomas dentro de um mês após a infecção, é importante destacar que os sintomas apresentados, principalmente em fase crônica da doença, têm impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos afetados, o que reflete em consequências socioeconômicas relevantes (Marimoutou *et al.*, 2015; Amaral *et al.*, 2023; Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

1.1.5. Patogênese

Com o estabelecimento da infecção, o CHIKV atinge células residentes da derme e inicia ciclos de replicação até que alcance a corrente sanguínea ou se dissemine através de células migratórias infectadas, pela linfa, dando início a eventos da patogênese viral, exemplificados na Figura 5 (Thérèse Couderc & Marc Lecuit, 2020).

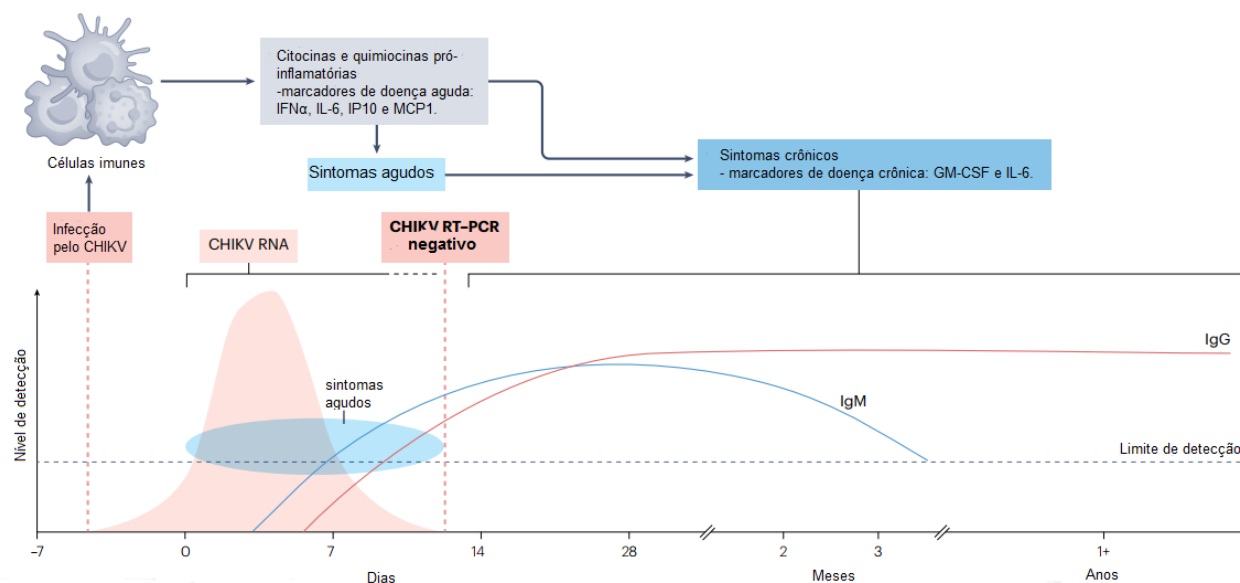


Figura 5. Imunopatogênese do CHIKV.

A partir da circulação viral e consequente produção de mediadores pró-inflamatórios, manifestam-se sintomas agudos. A partir do 14º d.p.i., na ausência de vírus circulante detectável, podem ser identificados sintomas crônicos artritogênicos, indicados por marcadores como GM-CSF e IL-6. Adaptado de Bartholomeeusen *et al.*, 2023.

Nesse contexto, o tropismo viral exerce uma influência direta na patogênese, refletindo na sintomatologia e na duração da infecção. Na pele, por exemplo, as primeiras células alvo de infecção compreendem os fibroblastos dérmicos, queratinócitos, melanócitos, células endoteliais, além das células de Langerhans e células dendríticas. Acredita-se, que a infecção dessas células residentes culmina na manifestação de erupções cutâneas maculopapulares, características da fase aguda da febre Chikungunya (Matusali *et al.*, 2019; NG, L. F. P., 2017).

Com a disseminação do CHIKV através do sistema sanguíneo e linfático, novos sítios de afinidade viral são atingidos, incluindo células do fígado, baço, endoteliais e monócitos no sangue periférico. Essas células têm sido identificadas como os principais locais periféricos de replicação viral, desempenhando um papel crucial na elevada viremia, que geralmente é resolvida após oito dias desde o início de sintomas (Labadie *et al.*, 2010).

Nesse estágio de alta viremia, há o início da produção de anticorpos neutralizantes. Inicialmente, são produzidos anticorpos da classe IgM, que podem ser detectáveis por um período de algumas semanas a meses. Posteriormente,

ocorre a produção de anticorpos da classe IgG, que mostra níveis crescentes ao longo do tempo até estabilização e, uma vez formados, podem conferir imunidade de longa duração contra infecções futuras juntamente com os linfócitos de memória (Lum & Ng, 2015; Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

Esses mecanismos desempenham um papel sequencial e coordenado com a progressão dos eventos da imunidade inata. Semelhante a outros *Alphavirus*, o CHIKV desempenha um papel importante na indução da produção de interferons tipo I, como o IFN- α e o IFN- β , e também é sensível à ação desses mediadores (Thérèse Couderc & Marc Lecuit, 2020). Além disso, em fase aguda da infecção é característico alta produção de IL-6, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1/CCL2) e CXCL10, sendo a alta presença de IFN- α , IL-6 e CXCL10 associada à maior incidência de poliartrite em fase crônica. Uma análise comparativa por metanálise revelou uma ampla gama de biomarcadores que compõem uma assinatura genérica da infecção em fase aguda, sendo eles citocinas pró-inflamatórias (IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18), citocinas anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4, IL-10), quimiocinas (CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL3, CCL4) e fatores de crescimento (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos - GM-CSF; fator de crescimento de fibroblastos - FGF) (NG, L. F. P., 2017). Dentre esses biomarcadores, IL-1 β , IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF) contribuem para a indução da febre que é frequentemente observada em pacientes infectados, devido à sua característica pirogênica. Além disso, prostaglandinas são altamente expressas por fibroblastos infectados, o que pode contribuir com a sensibilização e ativação nociceptora articular durante a patologia, principalmente em combinação à ação de IL-1 β , IL-6 e TNF no local (NG, L. F. P., 2017).

A enzima Arginase 1 (Arg1), produzida por macrófagos, por exemplo, também é implicada na resposta à febre Chikungunya, associada a lesões musculoesqueléticas observadas durante a infecção, contribuindo assim para a complexidade da resposta inflamatória associada à doença. Estudos sugerem uma correlação positiva entre a presença de Arg1 e a carga viral do paciente, bem como a gravidade da doença, indicado pela deleção da proteína reduzir carga viral e melhora de lesão (Stoermer *et al.*, 2012).

No contexto do sistema imune adaptativo, os linfócitos B desempenham papel na formação da memória imunológica e na eliminação sistêmica do vírus. As células T CD8+ são mais proeminentes nas fases iniciais da doença, enquanto as células T CD4+ entram em ação posteriormente para auxiliar na resposta humoral (Wauquier *et al.*, 2011). Vale ressaltar, que as células T CD4+ e CD8+ foram significativamente detectadas na sinóvia de pacientes que apresentaram inflamação crônica após infecção pelo CHIKV, indicando possível envolvimento nesse contexto (Hoarau *et al.*, 2010). Além disso, a depleção de células T CD4+ demonstra menor edema plantar e dano tecidual em camundongos, em relação a animais WT e nocautes para células T CD8+ durante infecção pelo CHIKV (Teo *et al.*, 2013). Por fim, é demonstrado papel de células T reguladoras no controle do dano articular durante infecção pelo CHIKV, por sua participação contra ativação excessiva de células T CD4+, de modo a diminuir o acúmulo dessas células em lesões musculoesqueléticas de camundongos infectados (Lee *et al.* 2015).

Quanto à fase crônica da doença, a citocina IL-6 e o fator GM-CSF emergem como principais marcadores associados à persistência das artralguas, por vezes correlacionada a um aumento em IL-17 (Amaral *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2022; Chow *et al.*, 2011; Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Tal fenômeno pode ser atribuído à ativação do Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B (RANKL) e a simultânea inibição da osteoprotegerina (OPG), levando a quadros de perda óssea, uma vez sendo associada participação da citocina IL-6 como inibidora de OPG e estimulante da expressão de RANKL, com consequente gênese de osteoclastos (Phuklia *et al.*, 2013; Noret *et al.*, 2012;). Além disso, GM-CSF emerge na manutenção da sobrevivência de neutrófilos, influenciando ativamente na progressão inflamatória da doença e, portanto, na progressão a quadros crônicos (Bartholomeeusen *et al.*, 2023; Srivastava *et al.*, 2020).

Ademais, a persistência de proteínas e RNA viral em macrófagos e fibroblastos sinoviais, mesmo na ausência de níveis detectáveis de vírus circulante, pode desempenhar um papel fundamental na manutenção da reatividade imune nas articulações ao longo da fase crônica da doença (Young *et al.*, 2019; Hoarau *et al.*, 2010). Em casos de resolução da doença, foi observado um aumento nos níveis de citocinas com propriedades anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , além da presença de um perfil de ativação M2 em macrófagos. Esses fatores em conjunto

criam um ambiente favorável para a promoção do reparo tecidual, contribuindo para a recuperação do hospedeiro (Srivastava *et al.*, 2020).

1.1.6. Diagnóstico, tratamentos e prevenção

Um diagnóstico definitivo de febre Chikungunya demanda muitas vezes o uso de testes diagnósticos, além da análise de manifestações clínicas, pela semelhança sintomatológica com outras arboviroses (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Durante a fase aguda de infecção, pode ser empregado teste molecular para detecção de RNA viral no soro ou plasma, por PCR de transcrição reversa, que proporciona um resultado de alta especificidade e sensibilidade. Ademais, também durante a fase aguda, é viável realizar testes para identificar a presença de vírus viável, por meio de técnicas de cultura, sendo de alta especificidade e com possibilidade de caracterização do microrganismo isolado. Ambos testes demandam equipamentos e instalações especializadas, além de limitações quanto ao valor e, em relação ao teste em cultura, quanto ao tempo necessário para obter resultados definitivos (Natrajan, Rojas & Waggoner, 2019; Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

A infecção pelo CHIKV também pode ser diagnosticada indiretamente por testes sorológicos, após o pico de viremia, como por testes rápidos para dosagem de anticorpos das classes IgM e IgG. É importante destacar, no entanto, que ao empregar esse método, é necessário ter cautela devido à possibilidade de reações cruzadas de anticorpos com outros *Alphavirus*, o que pode gerar resultados falsos positivos (Moreira, Dittrich & Siqueira, 2022; Stelitano *et al.*, 2019). De acordo com a OMS, é recomendado uso de testes tanto para identificação viral, quanto sorológicos, durante a primeira semana desde o início de sintomas relacionados à febre Chikungunya (WHO, 2016).

No que diz respeito ao tratamento da febre Chikungunya, os esforços concentram-se principalmente no controle e manejo dos sintomas de acordo com o estágio da doença em que o paciente se encontra. Para formas leves e agudas da doença, o tratamento inclui repouso, fluidoterapia e uso de analgésicos (Antunes *et al.*, 2016; Simon *et al.*, 2015).

A primeira abordagem para o controle da dor envolve a combinação de diferentes tipos de analgésicos. Isso inclui analgésicos de nível 1, como

paracetamol, analgésicos de nível 2, como a codeína e o tramadol, e anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como ibuprofeno, diclofenaco, aceclofenaco e naproxeno. Em situações em que a dor persiste ou é imediatamente intensa, especialmente após uma manifestação grave da infecção, analgésicos de nível 3 são empregados, esses compreendem opioides mais potentes. Ademais, antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes, como pregabalina e gabapentina, são prescritos em caso de dor neuropática (Webb *et al.*, 2022; Bartholomeeussen *et al.*, 2023).

Em casos graves de febre Chikungunya durante a fase aguda, que se caracterizam pela ocorrência de manifestações atípicas no sistema cardíaco, neurológico e respiratório, o cuidado e tratamento dos pacientes frequentemente exige hospitalização em unidades de terapia intensiva. Nesse cenário, é empregado um protocolo de tratamento de suporte voltado para a gestão de falência múltipla de órgãos (Webb *et al.*, 2022). Já na fase crônica da doença, a abordagem terapêutica concentra-se principalmente na utilização de corticosteroides, como a prednisona, juntamente com agentes antirreumáticos, tais como metotrexato e sulfasalazina, visando o controle dos sintomas articulares (Bartholomeeussen *et al.*, 2023). Além disso, há uma indicação crescente do uso de inibidores de TNF como parte do protocolo terapêutico (Bartholomeeussen *et al.*, 2023). Por fim, é importante considerar a necessidade de cuidados abrangentes visando à reabilitação física e psicológica (Antunes *et al.*, 2016; Webb *et al.*, 2022).

Ademais, novas abordagens terapêuticas para a febre Chikungunya estão sendo investigadas. Dentre elas, tem destaque uma terapia de anticorpos direcionada ao receptor Mxra8, cujo objetivo é neutralizar a entrada do vírus nas células hospedeiras e, assim, limitar sua replicação e disseminação (Song *et al.*, 2019). Outra abordagem em desenvolvimento engloba a aplicação do fármaco Fingolimod®, que se insere na categoria de moduladores dos receptores de esfingosina-1-fosfato (S1P) e apresenta como mecanismo de ação uma diminuição da migração das células do sistema imune, demonstrando, assim, potencial de atenuação da inflamação e do comprometimento articular (Teo *et al.*, 2017).

Quanto à prevenção da febre Chikungunya, são implementadas estratégias direcionadas ao controle do vetor, incluindo a eliminação de criadouros de água

parada e a aplicação de métodos químicos para limitar a população de mosquitos. Adicionalmente, a adoção de medidas para evitar a picada do mosquito também se mostra eficaz. Essas medidas englobam a utilização de repelentes, a minimização da exposição da pele, bem como instalação de telas e mosquiteiros em ambientes situados em áreas endêmicas (Barrera, 2022; WHO, 2022).

Recentemente têm surgido estratégias de controle genético do vetor, que envolvem, por exemplo, uso de RNA de interferência presente em armadilhas de contenção do mosquito, com o objetivo de silenciamento de alguns de seus genes essenciais. Além disso, a liberação de mosquitos geneticamente modificados também é explorada. Estes mosquitos são projetados para produzir apenas fêmeas estéreis, o que reduz significativamente a reprodução da população. Outra estratégia é a liberação de mosquitos previamente infectados pela bactéria do gênero *Wolbachia*, o que demonstra efeito na diminuição da capacidade de replicação e transmissão do vírus pelo vetor (Wang *et al.*, 2021; Aliota *et al.*, 2016).

Esforços também são colocados para contenção da doença por meio do desenvolvimento de vacinas. Atualmente, a vacina que se encontra em estágio mais avançado de desenvolvimento para o CHIKV é a VLA1553, já com a terceira fase de estudo clínico concluído e aplicação de licença ao FDA iniciada. Esta vacina é administrada em dose única e baseada em microrganismo atenuado. No entanto, é importante destacar que a VLA1553 apresenta algumas limitações, tais como a ocorrência potencial de artralgia transitória e febre após a administração, bem como a impossibilidade de utilização durante a gestação e por indivíduos imunocomprometidos (Wressnigg *et al.*, 2020; Roques *et al.*, 2022).

Outra candidata a vacina contra a febre Chikungunya é a PXVX0317, que possui vantagens significativas. Essa vacina é baseada em "virus-like particles", o que permite que ela seja segura para uso em gestantes e indivíduos com imunossupressão. Além disso, a PXVX0317 é termoestável, o que simplifica a distribuição e armazenamento, além de demandar uma dose para imunização completa. A desvantagem associada a essa vacina, que se encontra em fase três de estudo clínico, é a necessidade de associação a adjuvante (Goo *et al.*, 2016). Esses avanços são cruciais no desenvolvimento de estratégias de vacinação eficazes e abrangentes para combater a disseminação do CHIKV.

1.2. Fibroblastos sinoviais

Fibroblastos são células residentes teciduais, que contribuem com a patogênese de uma variedade de doenças inflamatórias, como a febre Chikungunya. Quando presentes na arquitetura de articulações sinoviais, essas células se distribuem ao longo da membrana sinovial e assumem papel fundamental na manutenção da homeostase articular, bem como durante processos artritogênicos (Wu et al., 2021).

A membrana sinovial, destacada na Figura 6, está localizada dentro da camada interna da cápsula articular e revela-se como uma estrutura altamente especializada, caracterizada por uma camada íntima, que consiste em duas a três células de espessura, composta por macrófagos (sinoviócitos tipo A) e fibroblastos sinoviais (sinoviócitos tipo B). Além disso, a membrana apresenta uma camada subíntima, composta por uma matriz tecidual adiposa e uma rede de vasos sanguíneos, na qual macrófagos e fibroblastos estão dispostos de maneira menos densa em comparação com a organização celular observada na camada íntima (Wu et al., 2021; Filer, 2013).

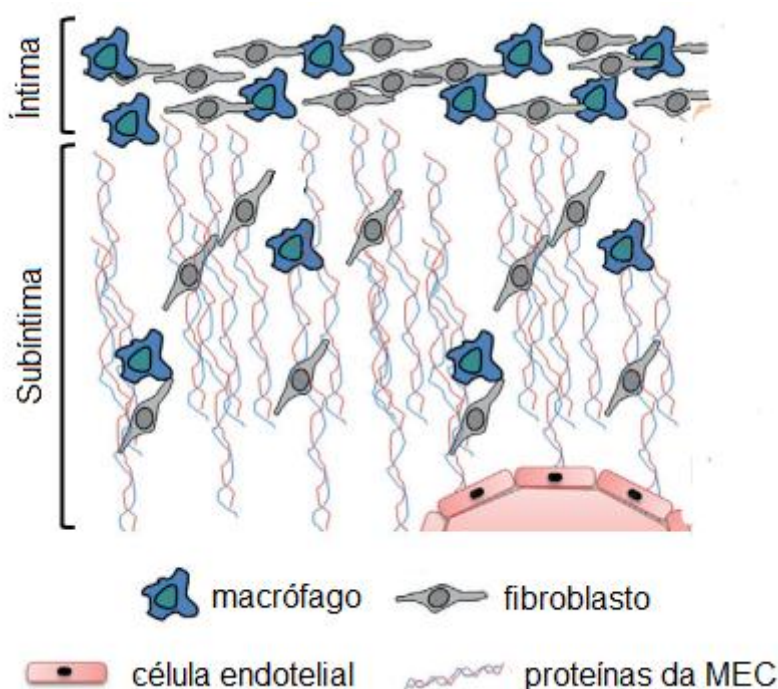


Figura 6. Arquitetura articular saudável.

Organização celular da membrana sinovial em camadas específicas, além de componentes ósseos e de cartilagem íntegros. Adaptado de Filer, 2013.

1.2.1. Morfologia e subpopulações

Fibroblastos sinoviais (FLS) são células de origem mesenquimal, caracterizados por sua morfologia fusiforme com longos e finos processos citoplasmáticos. Apresentam o citoplasma basofílico com extensa rede de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e um complexo de Golgi bem desenvolvido, evidenciando sua atividade secretora ativa. Além disso, a estrutura nuclear exibe uma forma oval e de tamanho considerável, frequentemente contendo um ou dois nucléolos (Konttinen *et al.*, 1988; Croft *et al.*, 2019).

Essas células podem ser classificadas em subpopulações específicas segundo variações na expressão de marcadores de superfície, o que, por sua vez, está intimamente ligado às suas características funcionais. Estes marcadores compreendem a proteína de ativação de fibroblastos (FAP) e o cluster de diferenciação 90 (CD90), reconhecido também como Thy-1. FAP é uma serina protease de superfície celular tipo II, que desempenha um papel essencial na degradação da matriz extracelular (MEC), participando, assim, de eventos de reparo e remodelação tecidual (Bauer *et al.*, 2022). Além disso, a expressão elevada de FAP por parte de FLS tem sido frequentemente vinculada a cenários clínicos de artrite reumatoide e osteoartrite (Bauer *et al.*, 2022; Pap *et al.*, 2020; Filer, 2013). CD90, em contraste, é uma glicoproteína de adesão, cujas funções associam-se à síntese e liberação de fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular (Kisselbach *et al.*, 2009).

Através desses marcadores é possível identificar uma subpopulação de FLS FAP+ e CD90-, presentes na camada íntima da membrana sinovial e de caráter mais ativo e destrutivo, os quais desempenham um papel crucial na erosão óssea e na deterioração da cartilagem em condições patológicas. Na camada subíntima, por sua vez, encontram-se FLS da subpopulação FAP+ e CD90+, fenótipo intermediário, envolvidos principalmente na manutenção e persistência de processos inflamatórios, além de fibroblastos FAP- e CD90+, cujas funções relacionam-se a processos de cicatrização (Pap *et al.*, 2020; Croft *et al.*, 2019; Chellini *et al.*, 2018).

O fenótipo e a função dos FLS podem sofrer modificações mediante o contato direto com outras células, mediadores hormonais e componentes da matriz extracelular (MEC). Essa modificação pode ser evidenciada, por exemplo, pelo

contraste de funcionalidades que os FLS assumem em homeostase e durante processos inflamatórios e de reparo (Konttinen *et al.*, 1988; Croft *et al.*, 2019).

1.2.2. Função

Durante a homeostase, FLS têm um papel ativo na produção de componentes importantes do líquido sinovial, como o ácido hialurônico e a lubrificina. Além disso, eles contribuem para a construção da MEC, produzindo fibronectina, colágenos, tenascina, proteoglicanos, laminina, e secretando enzimas como proteases e metaloproteinases de matriz, que remodelam e mantêm a integridade da MEC (Nygaard *et al.*, 2020). Sob condições artríticas, os FLS adquirem um caráter altamente proliferativo, levando ao aumento da espessura da camada íntima da membrana sinovial, além de exibirem um perfil invasivo, que contribui para a progressão da destruição tecidual adjacente. Ademais, produzem e secretam enzimas, como colagenases e catepsinas, que promovem um desequilíbrio na MEC e estimulam a migração de células imune e degradação de osso e cartilagem (Wu *et al.*, 2021; Mizoguchi *et al.*, 2018). Além disso, os fibroblastos passam a produzir e secretar RANKL, que estimula a diferenciação e ativação de osteoclastos, e DKK-1, que inibe a função anabólica de osteoblastos, dificultando o processo de reparo ósseo (Komatsu & Takayanagi, 2022; Diarra *et al.*, 2007). De forma mais detalhada, no que diz respeito aos mecanismos subjacentes à sinalização de RANKL, o ligante interage com seu receptor, RANK, o que por sua vez ativa vias de sinalização intracelular ligada aos fatores NF- κ B e AP-1. Isso culmina na amplificação de NFATc1, um regulador essencial para a diferenciação e formação dos osteoclastos, principalmente a partir de um desequilíbrio nos níveis de osteoprotegerina, molécula que inibe a interação RANK-RANKL (Komatsu & Takayanagi, 2022; Filer, 2013).

No que diz respeito à geração de mediadores inflamatórios, os FLS produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, e desempenham um papel no recrutamento de células imunes, como neutrófilos, monócitos e linfócitos, ao produzir e liberar quimocinas como CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL10, CCL2 e CCL5. Além disso, os FLS perturbam processos apoptóticos, prolongando a sobrevivência das células inflamatórias, através da liberação de fatores como IFN- α , IL-6 e GM-CSF, enquanto também expressam molécula de adesão VCAM-1. Essas ações interferem nos mecanismos resolutivos da inflamação e compõem o ambiente artrítico clássico,

como demonstrado na Figura 7 (Nygaard *et al.*, 2020; Mizoguchi *et al.*, 2018; Filer, 2013).

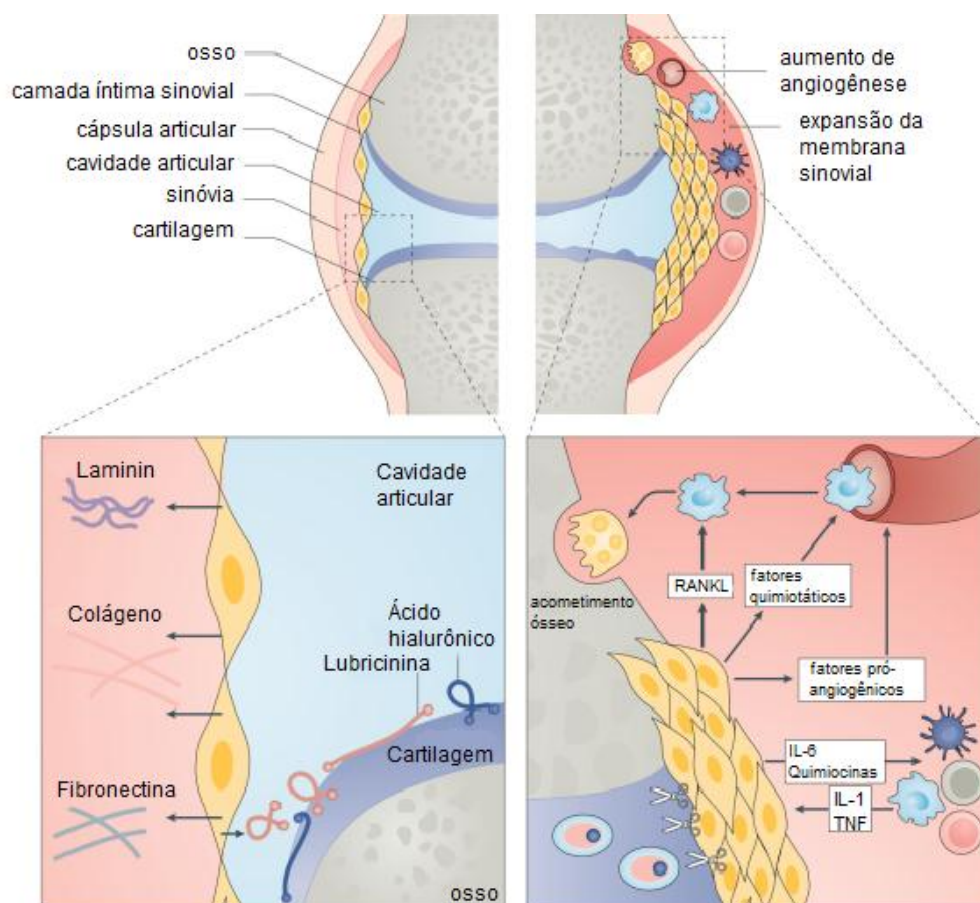


Figura 7. Ampla funcionalidade de FLS.

Essas células apresentam, além de funções clássicas de manutenção de composição do líquido sinovial e MEC, uma participação ativa no contexto artrítico através da modulação da inflamação, influenciando diretamente no desfecho da doença. Adaptado de Nygaard *et al.*, 2020.

Essas modificações fenotípicas de FLS resultam em uma ativação permanente, através de alterações epigenéticas, mantidas mesmo na ausência de estímulos inflamatórios contínuos, o que contribui para a continuação do processo fisiopatológico e viabiliza o avanço das condições patológicas até estágios crônicos (Pap *et al.*, 2020; Nygaard *et al.*, 2020).

1.3. Controle da inflamação

Como um evento iniciado rapidamente em consequência da ativação da imunidade inata, a inflamação é um processo associado a alterações de vasos sanguíneos que favorecem o recrutamento celular e a chegada de elementos solúveis no tecido, fatores que permitem a neutralização e eliminação de estímulos danosos ao organismo. Além disso, a resposta inflamatória é importante para a remoção de células danificadas e estimula a restauração do tecido lesado, promovendo a manutenção da arquitetura e da função teciduais. Porém, a inflamação precisa ser muito bem regulada para que ela própria não cause danos teciduais locais ou sistêmicos, como visto em doenças autoimunes e infecciosas, principalmente em quadros de hiperinflamação ou inflamação persistente/crônica. Este equilíbrio entre intensidade, durabilidade e efetividade da resposta inflamatória está associado diretamente com a eliminação dos estímulos iniciais que a causaram e por mecanismos ativados que levam ao seu próprio fim, como os eventos envolvidos na resolução da inflamação (Souza *et al.*, 2013).

A resolução do processo inflamatório é um evento ativo e fundamental para o retorno das funções teciduais. Seus princípios básicos estão associados com a eliminação de células previamente recrutadas e acumuladas no tecido, como através de apoptose, principalmente de células polimorfonucleares. O engolfamento de células apoptóticas por macrófagos, fenômeno conhecido como eferocitose, é fundamental para a remoção de debris celulares, mas também promove a troca de perfil de mediadores pró-inflamatórios para mediadores pró-resolutivos por estes macrófagos (Fullerton & Derek, 2016). Além disso, células mononucleares são recrutadas nesta etapa, as quais amplificam a produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, que otimizam o processo de término da inflamação, com promoção do reparo tecidual. Deste modo, para o controle da inflamação, em contraste com perspectivas terapêuticas anti-inflamatórias clássicas, que se concentram na inibição de síntese de mediadores pró-inflamatórios ou no antagonismo de seus receptores, a farmacologia por mediadores pró-resolutivos volta-se para a reprogramação celular através da ativação de vias ou de receptores associados aos mecanismos de resolução da inflamação. Ultrapassando algumas das limitações apresentadas por medicamentos anti-inflamatórios, como potencial risco de imunossupressão, dano tecidual colateral em órgãos específicos, como o

fígado, e indução da produção de autoanticorpos, a farmacologia de resolução está associada com alterações duradouras por regulação epigenética e transcricional, de modo que a imunossupressão seja evitada e a célula preserve a capacidade de responder a demais sinais danosos (Perretti & Jesmond, 2022). Portanto, a exploração terapêutica desses mediadores resolutivos se delinea como uma perspectiva valiosa na busca por estratégias farmacológicas inovadoras, visando mitigar as manifestações patológicas associadas à inflamação de maneira eficaz e com menor propensão a efeitos adversos. Dentre os mediadores explorados na farmacologia de pró-resolutivos encontram-se, dentre outras, as lipoxinas, resolvinas, melanocortinas e anexinas (Perretti *et al.*, 2017).

1.3.1. Anexina A1

Representando cerca de 2% do total de proteínas celulares, as anexinas estão distribuídas entre os eucariotos em categorias: grupo A em vertebrados; grupo B em invertebrados; grupo C em fungos e organismos unicelulares; grupo D em plantas; e, finalmente, grupo E em protistas. Essas proteínas têm a capacidade de se associar a fosfolipídios de maneira dependente a cálcio, desempenhando funções cruciais na regulação e organização estrutural celular. Além disso, apesar de apresentarem porções bem conservadas entre si, as anexinas diferem-se entre si em pelo menos duas propriedades: a concentração de cálcio necessária para a ligação aos fosfolipídios e a afinidade para os diferentes tipos de fosfolipídios (Han *et al.*, 2020; Moss & Morgan, 2004).

O grupo A consiste em um conjunto de 12 proteínas (Anexina A1-A11 e Anexina A13) com uma ampla presença em tecidos humanos. Inicialmente referida como lipocortina, a Anexina A1 (ANXA1) teve seu primeiro registro documentado em 1979 por Flower e Blackwell (Flower e Blackwell, 1979). Esta proteína desempenha um papel notório em processos fundamentais, tais como apoptose, diferenciação celular e modulação de respostas inflamatórias (Kelly *et al.*, 2022).

1.3.2. Estrutura e localização

A proteína ANXA1 demonstra em condições homeostáticas uma expressão constitutiva preferencial em células do sistema imune inato, notadamente em neutrófilos e macrófagos, enquanto sua expressão em células do sistema imune

adaptativo é comparativamente restrita, manifestando níveis discretos de expressão em linfócitos T e linfócitos B. Em geral, também está presente no citosol de células epiteliais pulmonares, mesangiais renais e de fibroblastos (Resende *et al.*, 2023; Han *et al.*, 2020; Kelly *et al.*, 2022).

Localizado na região cromossômica humana 9q12-q21.2, o gene ANXA1 codifica uma proteína de 346 aminoácidos, com um peso molecular de 37 quilodaltons (kDa), cuja expressão é estimulada por glicocorticoides endógenos ou exógenos (Liu *et al.*, 2014). Essa proteína é constituída por uma porção central próxima à extremidade C-terminal, altamente conservada entre as anexinas, e uma cauda na extremidade N-terminal, exclusiva para cada membro da família. Na região central da proteína podem ser identificadas quatro repetições homólogas constituídas por α -hélices. Estas repetições incluem sítios de ligação ao cálcio que interagem com a membrana fosfolipídica adjacente. A porção N-terminal da proteína, também sensível à presença de cálcio, é inicialmente encontrada em proximidade à terceira repetição do domínio central. No entanto, à medida que a concentração de íons cálcio aumenta essa porção é liberada, resultando na exposição dos sítios de ligação iônicos. Essa interação induz a formação de uma região hidrofóbica de interação com a membrana celular, a qual desempenha um papel crucial na externalização e funcionalidade da proteína (Donnelly & Moss, 1998; Han *et al.*, 2020). Além disso, peptídeos sintéticos que mimetizam a ação da ANXA1 são derivados dessa porção N-terminal, como, por exemplo, a molécula Ac2-26 destacada na Figura 8. Esse peptídeo é constituído pelos 26 aminoácidos da cauda N-terminal da ANXA1 associados a um grupo acetil, que confere estabilidade, e, assim como a proteína, demonstra função biológica resolutive (Resende *et al.*, 2023; Sugimoto *et al.*, 2016). Ademais, é válido pontuar que durante processos inflamatórios a ANXA1 pode ser clivada em um peptídeo de 33 kDa pela enzima proteinase-3 ou ação de elastases neutrofílicas, sendo essa isoforma inativa (Sugimoto *et al.*, 2016).

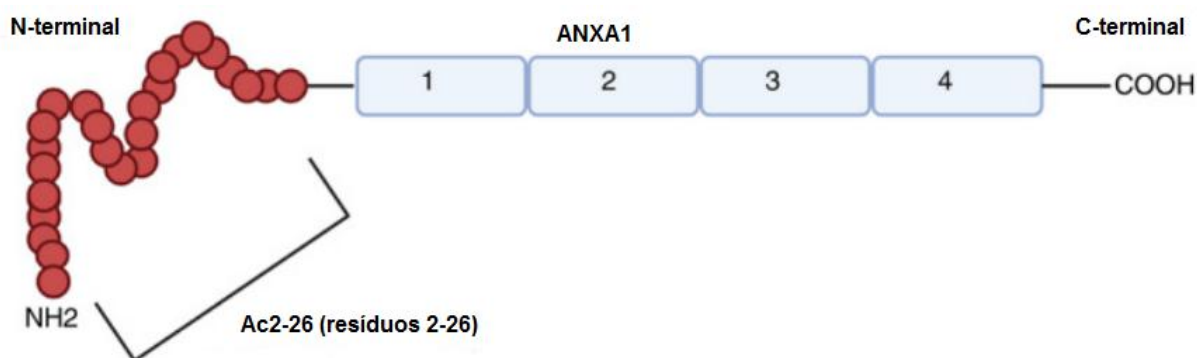


Figura 8. ANXA1 e Ac2-26.

Estrutura da proteína ANXA1, composta por região conservada próxima à porção C-terminal, formada por quatro regiões em repetição, e porção N-terminal funcional, cuja sequência de resíduos 2-26 compreende o peptídeo ativo Ac2-26. Adaptado de Kelly *et al.*, 2022.

1.3.3. Interação com receptor e cascata de sinalização

A fim de desempenhar suas funções biológicas, a proteína ANXA1 necessita ser translocada do citosol para o meio extracelular, um processo que é executado através de mecanismos intrínsecos a cada célula. Esse processo pode envolver fosforilação de resíduo de serina na porção N-terminal da proteína (serina-27), indução da atividade do transportador ABC ou fusão de grânulos contendo ANXA1 com a membrana plasmática. Dessa forma, após a ativação celular e subsequente externalização, a ANXA1 tem a capacidade de interagir com seus receptores por vias autócrinas, parácrinas ou justácrinas (Han *et al.*, 2020; Perretti & D'Acquisto, 2009).

A ANXA1 estabelece interações principalmente com receptores de formil peptídeos 2 (FPR2), os quais pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G e participam de processos de quimiotaxia e ativação celular por sua ampla variedade de ligantes, muitas vezes competitivos à ANXA1, como a lipoxina A4 e a proteína amilóide sérica A. A expressão desses receptores é observada em diversos tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos, monócitos, células epiteliais e endoteliais (Kelly *et al.*, 2022; Perretti & D'Acquisto, 2009). Por meio da interação a esse receptor, a ANXA1 desencadeia uma sequência de eventos de sinalização intracelular. Esse processo envolve a ativação da proteína Gs, que subsequentemente ativa efetores celulares, incluindo enzimas como a adenilil

ciclase e a fosfolipase. Essas enzimas iniciam cascatas de sinalização intracelulares, resultando na formação de segundos mensageiros como o cálcio e o cAMP. Esses segundos mensageiros, por sua vez, desempenham um papel crucial orquestrando respostas celulares específicas (Kelly *et al.*, 2022).

1.3.4. Funções

A funcionalidade da ANXA1, demonstrada na Figura 9, reside principalmente na sua capacidade de interação às membranas celulares de modo reversível e regulado, como por modificações pós-traducionais, além de interações em sua porção ativa N-terminal, através de reações de glicosilação e clivagem, por exemplo (Han *et al.*, 2020).

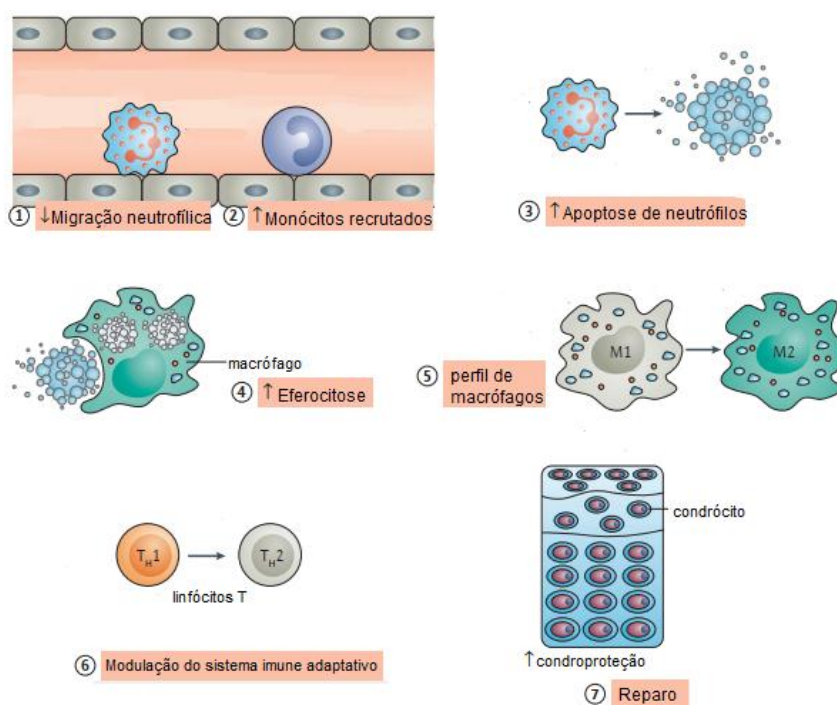


Figura 9. Ações pró-resolutivas da ANXA1.

A proteína apresenta ampla participação em eventos de controle inflamatório e estímulo resolutivo, atuando sob diferentes tipos celulares. Adaptado de Perretti *et al.*, 2017.

Um grande papel atribuído à ANXA1 é a sua capacidade de modular processos inflamatórios. Essa função pode ser executada por regulação enzimática, por exemplo através da inibição da enzima fosfolipase A2 (PLA2), o que evita a formação de mediadores pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico. Também demonstra ação de inibição das enzimas óxido nítrico sintase (iNOS) e

ciclo-oxigenase-2 (COX-2) através da indução de liberação de IL-10, fator anti-inflamatório (Parente & Solito, 2004; Ferlazzo *et al.*, 2003). Além disso, no contexto do processo inflamatório, a ANXA1, bem como o peptídeo Ac2-26, medeia a interação entre leucócitos e células endoteliais. Essa função visa alcançar um equilíbrio na transmigração de leucócitos através da inibição da atividade de moléculas de adesão, como de integrinas, ou até mesmo por ativação de ERK1/2, que aumenta o nível de cálcio intracelular e, conseqüentemente, diminui a adesão e migração leucocitária (Hayhoe *et al.*, 2006; Solito *et al.*, 2000). Essa regulação também se manifesta no controle da migração de neutrófilos através da dessensibilização do receptor FPR, que, após ser sensibilizado por peptídeos bacterianos, direcionaria a célula para o sítio de infecção. Assim, a proteína é capaz de regular os níveis de extravasamento celular, contribuindo com a manutenção da integridade vascular e intensidade de infiltrado durante o processo inflamatório (Belvedere *et al.*, 2014).

Outra função notável da ANXA1 e do peptídeo Ac2-26 inclui seu efeito pró-apoptótico sobre neutrófilos. Esse efeito está relacionado à inibição de vias de sobrevivência, associadas às proteínas Mcl-1, ERK1/2 e NF- κ B, e ativação de vias de morte celular Bax e caspase-3 (Vago *et al.*, 2012). Uma célula destinada à apoptose apresenta marcadores extracelulares específicos, como fosfatidilserinas, que permitem o seu reconhecimento e remoção pelos macrófagos. Associando-se a essas marcações, a ANXA1 presente em neutrófilos apoptóticos é translocada para a membrana dessas células, otimizando o processo de recrutamento. De modo interessante e relacionado, macrófagos liberam ANXA1 de modo a opsonizar neutrófilos apoptóticos adjacentes e, conseqüentemente, aumentar sua captação por fagócitos (Sugimoto *et al.*, 2016; Poon *et al.*, 2014). O papel dessas moléculas também se estende à promoção do recrutamento de monócitos não flogísticos da circulação sanguínea, via produção de quimiocinas, como CCL2, facilitando a limpeza eficaz do tecido em processo inflamatório (Sugimoto *et al.*, 2016). Esses fatores em conjunto alinham-se a um aumento nos processos de eferocitose e na reprogramação de macrófagos para um perfil resolutivo (M2), que leva à redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no tecido, IL-1, IL-6, TNF, como em um ambiente de condroproteção, além de resultar em um aumento na liberação de

citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (Perretti *et al.*, 2017; Sugimoto *et al.*, 2016).

Por fim, a ANXA1 ainda exerce influência sobre processos celulares relacionados à diferenciação e proliferação, especialmente em linfócitos T, alcançado, por exemplo, através da interação com o receptor FPR1, que por sua vez modula as vias de sinalização ERK-MAPK e aumenta a atividade de receptores TCR (Kelly *et al.*, 2022).

Deste modo, é evidente a contribuição da ANXA1 e do peptídeo Ac2-26 para além das funções anti-inflamatórias, atuando fundamentalmente em eventos essenciais de resolução da inflamação. Essa funcionalidade torna essa molécula de interesse em um amplo espectro de doenças inflamatórias, que incluem a febre Chikungunya.

1.3.5. Participação da ANXA1 em doenças artritogênicas

A capacidade da ANXA1 e do Ac2-26 em modular vias de sinalização inflamatória, reduzir a migração de leucócitos, promover a remoção de células apoptóticas, além de estimular eventos de eferocitose e reprogramação de macrófagos, converge para a criação de um microambiente propício à resolução de processos inflamatórios, como os articulares. Frequentemente, o tratamento de doenças artritogênicas resulta em episódios de resistência e efeitos colaterais significativos, ressaltando a urgência na busca de abordagens terapêuticas inovadoras, como pelo uso de ANXA1 e seus derivados ativos (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016; Kelly *et al.*, 2022).

No contexto de um modelo de artrite reumatoide em camundongos, foi observado que a ANXA1 e o Ac2-26 têm uma influência inibitória sobre a adesão e exsudação de neutrófilos. Essa influência ocorre através da interação dessas moléculas com receptores tirosina-carboxi-terminal presentes nas células inflamatórias. Além disso, verificou-se que a expressão aumentada da ANXA1 induzida experimentalmente está associada a uma reversão dos sintomas observados no modelo de artrite em ratos (Haridas *et al.*, 2019; Mei *et al.*, 2017).

Em modelos de artrite induzida por antígeno em camundongos nocaute para ANXA1, foi observado uma resposta inflamatória exacerbada na articulação,

associada ao aumento da expressão de mRNA sinovial de IL-1 β , TNF, IL-6, danos mais severos na cartilagem, além de redução significativa quanto à eficácia anti-eritrogênica do glicocorticoide dexametasona (Yang *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2012; Yang, Morand & Leech, 2013; Perretti *et al.*, 2017).

Outro estudo demonstra que glicocorticoides, como prednisolona e dexametasona, têm o efeito de aumentar a expressão de ANXA1 em fibroblastos sinoviais. Esse aumento na expressão de ANXA1 resulta na inibição da atividade do fator de transcrição NF- κ B e na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, o que consequentemente reduz a inflamação nas articulações nesse modelo experimental (Morand *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). No entanto, em contrapartida, observou-se que o efeito da ANXA1 em células T, no mesmo modelo de artrite induzida por colágeno, resultou em um aumento da inflamação articular associado a uma elevada liberação de IFN- γ por células T do tipo Th1 (D'Acquisto *et al.*, 2007).

No que diz respeito a modelos de osteoartrite, observou-se uma inclinação para a diminuição da presença de ANXA1 na cartilagem de indivíduos que sofrem da doença em comparação à cartilagem de indivíduos controle, indicando participação da proteína na fisiopatologia da doença (Jeremiasse *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2008). Ademais, em modelos experimentais de gota, foi observado que a ANXA1, através do peptídeo Ac2-26, desencadeou um aumento na apoptose de neutrófilos, acelerando processos resolutivos, além de demonstrar influência sob a ativação de inflamassoma, presente na imunopatologia gotosa (Galvão *et al.*, 2017; Galvão *et al.*, 2020).

Já quanto ao cenário infeccioso, durante o desenvolvimento da artrite causada pelo vírus Chikungunya, é observado que indivíduos infectados exibem uma redução nos níveis séricos de ANXA1 em comparação com pessoas saudáveis (Puttamallesh *et al.*, 2013). Além disso, uma relação causal pode emergir da constatação de que a administração de glicocorticoides revela eficácia no gerenciamento de sintomas clínicos crônicos associados à febre Chikungunya, o que pode ser atribuído à influência da ANXA1, uma vez que sua produção é induzida como resposta à cascata de sinalização dos glicocorticoides (Yang *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2012). Além disso, em modelo murino de infecção pelo CHIKV a administração de Ac2-26 revelou-se eficaz na modulação da resposta inflamatória,

pela redução no acúmulo neutrofílico e de mediadores pró-inflamatórios na pata, atenuação de edema plantar e hipernocicepção, evidenciando potencial terapêutico da ANXA1 no contexto de infecção pelo CHIKV (de Araújo *et al.*, 2022).

Considerando que a gravidade do processo inflamatório está relacionada ao desfecho da doença causada pelo CHIKV, a gestão dos eventos resolutivos pode desempenhar um papel central na prevenção de quadros crônicos da doença (Srivastava *et al.*, 2020). Ao explorar a caracterização dos fibroblastos sinoviais, é notório que a presença positiva de FAP e CD90 proporciona um perfil celular que perpetua a produção constante de citocinas e quimiocinas em nível local, retardando assim a resolução da inflamação (Croft *et al.*, 2019). Portanto, caracterizar o ambiente articular durante a infecção pelo CHIKV é imprescindível para compreensão da perpetuação do processo inflamatório e, por conseguinte, desfecho da doença. Além disso, a perspectiva de direcionar esses fibroblastos sinoviais pela proteína ANXA1 poderia mitigar o aumento de quadros crônicos da doença e, conseqüentemente, promover a resolução dos sintomas artritogênicos, reduzindo a necessidade de tratamentos anti-inflamatórios contínuos e promovendo melhoras significativas na qualidade de vida de indivíduos afetados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o perfil celular e de mediadores presentes na articulação tibiofemoral durante infecção pelo vírus Chikungunya e o efeito do pró-resolutivo Ac2-26 sob esse ambiente articular.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a relevância da ANXA1 sob a articulação tibiofemoral durante a infecção pelo CHIKV em animais nocaute para a proteína;
2. Investigar a influência do peptídeo Ac2-26 em administração sistêmica e intra-articular frente à hipernocicepção induzida pela infecção do CHIKV;
3. Determinar o perfil celular de FLS presentes no tecido sinovial da articulação tibiofemoral durante infecção pelo CHIKV e avaliar a atividade destas células após o tratamento com Ac2-26;
4. Investigar o efeito do peptídeo Ac2-26 em administração sistêmica e intra-articular sob a presença de mediadores imunes no coxim plantar de animais infectados pelo CHIKV;
5. Padronizar infecção pelo CHIKV em cultura primária de FLS derivados da membrana sinovial da articulação tibiofemoral de camundongos;
6. Caracterizar carga viral e o nível da citocina IL-6 em cultura primária de FLS infectada pelo CHIKV e tratada com diferentes concentrações de Ac2-26.

3. MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos tipo “selvagem” (*Wild type* - WT), machos, das linhagens C57BL/6 e BALB/c com quatro a cinco semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, além de camundongos deficientes para ANXA1 (*background* BALB/c) machos e fêmeas, com quatro a cinco semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, em estantes com filtros de entrada e saída de ar, condições controladas de temperatura (28 °C) e luz (ciclo claro/escuro de 12/12h), com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos descritos neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolos CEUA 135/2019 e 229/2021).

3.2 Vírus

Foi empregada experimentalmente uma linhagem asiática do CHIKV (genótipo ECSA – cepa BHI3762 / H804917) isolada de uma amostra clínica de um paciente virêmico, gentilmente cedida pelo prof. Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

O vírus foi propagado em células de mosquitos *Aedes albopictus* (clone C6/36) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número 0343, mantidas em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) de atmosfera umidificada a 37°C, em meio de cultivo Leibowitz L-15 (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 2% Soro Fetal Bovino (SFB) por cinco a sete dias. Posteriormente, foi coletado sobrenadante dessa cultura de células C6/36 infectadas pelo CHIKV, centrifugado (600 g / 10 min) e, então, adicionado em uma coluna de concentração viral (Vivacell 100 centrifugal concentrator – Sartorius, Alemanha). A partir de centrifugação (2000 g / 10 min), o volume que ultrapassou a membrana da coluna foi descartado e o sobrenadante remanescente no concentrador foi aliquoteado e armazenado em freezer -80 °C.

O título viral do estoque foi determinado através do ensaio de formação de placas de lise em células permissivas da linhagem VERO CCL81 (BCRJ 0245), derivadas de fibroblastos de rim de macaco verde africano – *Cercopithecus aethiops*. Essas células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂, em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado com 1,5 % HEPES, 1 % antibióticos, 1 % L-Glutamina, 1 % aminoácidos não essenciais e 10 % SFB, em seguida foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 6 ou 12 poços contendo 1x10⁶ células/poço ou 5x10⁵ células/poço, respectivamente. Quando os poços alcançaram uma monocamada com confluência de 85 a 90 %, foi adicionado 400 µL (para placa de 6 poços) ou 300 µL (para placa de 12 poços) do estoque viral diluído serialmente em meio RPMI (10⁻² a 10⁻⁷) e adicionado apenas meio RPMI em poços controle não inoculados. Após 1 h em estufa a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂, período de adsorção viral pela célula hospedeira, os poços foram lavados com meio RPMI e finalmente adicionado meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 1,6 % de carboximetilcelulose, 1 % antibióticos e 2 % de SFB. As placas foram, então, incubadas por quatro dias em estufa a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂ e posteriormente fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos. Por fim, as placas foram coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em água deionizada e o título viral avaliado e expresso em unidades formadoras de placa (PFU) por mililitro (mL) (Baer & Kehn-Hall, 2014).

3.3 FÁRMACO

Empregamos em estratégia terapêutica o peptídeo Ac2-26, que contém a porção N-terminal ativa da ANXA1 (NEP-New England Peptide, lote #PR7467). O peptídeo foi inicialmente eluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 2 % e, em seguida, em solução salina estéril para administração.

Em estratégia de tratamento por administração sistêmica, foi aplicada dose de 150 µg por animal em um volume de 100 µL, por via intraperitoneal (i.p.), conforme previamente estabelecido em trabalho prévio do laboratório (Galvão *et al.*, 2017; de Araújo *et al.*, 2022). Já em estratégia de tratamento por administração local, foi aplicada dose de 10 µM por animal em um volume de 10 µL, por via intra-articular (i.a.) na articulação tibiofemoral.

3.4 Modelo experimental *in vivo*

A infecção dos camundongos foi realizada por via intradérmica (i.d.) na pata direita traseira, com um inóculo de 10^6 PFU de CHIKV em volume de 50 μ L, padronizado em trabalho prévio publicado do grupo (Moreira *et al.*, 2022). Os camundongos controle receberam o mesmo volume por via i.d. na pata direita traseira de solução salina.

Os camundongos WT da linhagem BALB/c e camundongos deficientes para ANXA1 (*background* BALB/c) foram infectados pelo CHIKV e eutanasiados no terceiro e sétimo dia pós-infecção (d.p.i.), quando o tecido da articulação tibiofemoral direito foi coletado para preparação de lâminas e análise histopatológica. O experimento foi conduzido para investigar uma possível influência direta da ANXA1 sobre a articulação tibiofemoral durante a infecção pelo CHIKV. A Figura 10 ilustra esse desenho experimental.

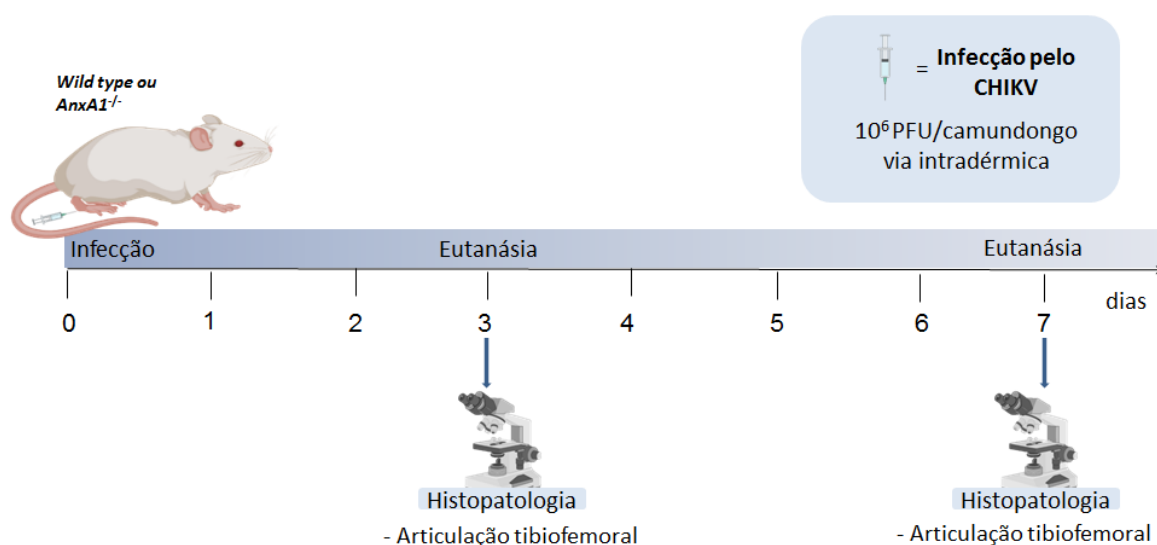


Figura 10. Delineamento experimental.

Camundongos selvagem e nocaute para ANXA1, machos e fêmeas, com 4 semanas de idade, foram infectados por via i.d. com inóculo de 10^6 PFU de CHIKV em volume de 50 μ L, enquanto que camundongos controle negativo, Mock, receberam solução salina em mesmo volume e via. Os animais foram eutanasiados no 3^o e 7^o d.p.i. e a articulação tibiofemoral coletada para processamento histopatológico.

Para os camundongos WT da linhagem C57BL/6, com a infecção no dia zero, foram implementadas estratégias terapêuticas adequadas, tanto de tratamento por via de administração sistêmica, quanto local, até a eutanásia realizada no 7^o d.p.i.. Essas estratégias foram aplicadas para a compreensão dos efeitos terapêuticos do peptídeo Ac2-26 no contexto da infecção pelo CHIKV.

A estratégia de tratamento por via de administração sistêmica consistiu na aplicação de uma primeira dose de Ac2-26 aproximadamente 1 h antes da infecção, seguida de doses diárias até o 6º d.p.i.. Já para a estratégia de tratamento por via de administração local, a primeira dose de Ac2-26 foi aplicada 3 h após a infecção, seguida de uma segunda dose no 3º d.p.i.. Os animais passaram por avaliação da hipernocicepção mecânica e coleta de tecido do coxim plantar direito traseiro para ensaio ELISA. Além disso, após a eutanásia de animais que receberam o tratamento com Ac2-26 por via de administração i.p., foram coletadas amostras de tecido sinovial da articulação tibiofemoral direita para análise por citometria de fluxo. A Figura 11 resume de forma didática os esquemas terapêuticos em cada uma das vias de administração testadas.

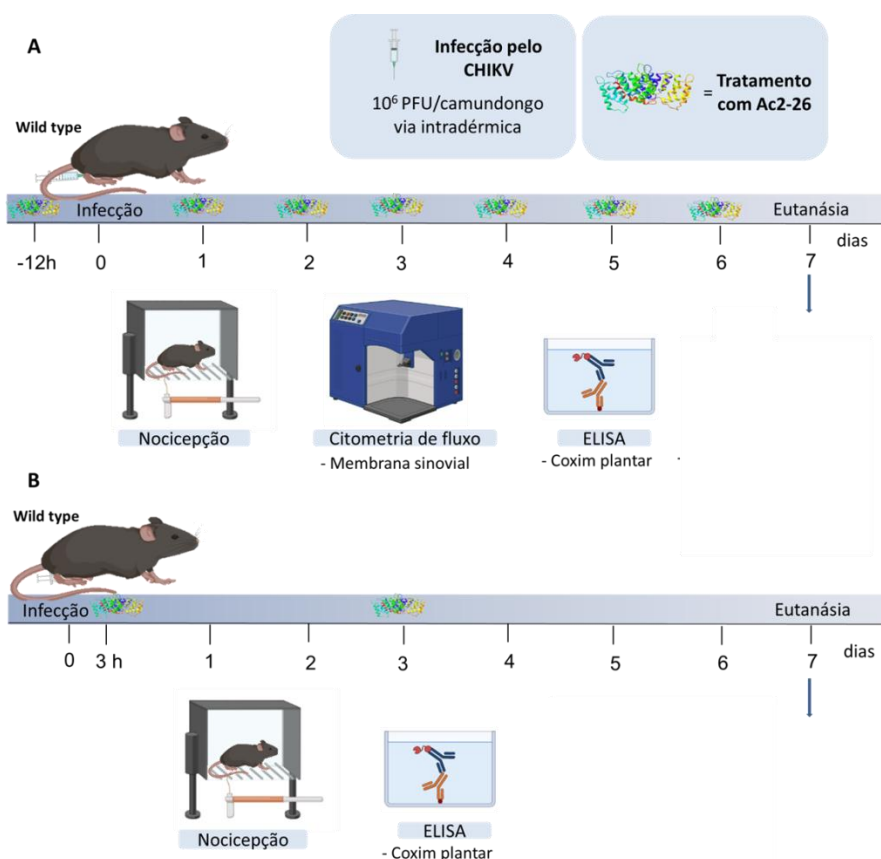


Figura 11. Estratégia experimental de tratamento da infecção pelo CHIKV com peptídeo Ac2-26.

Camundongos selvagem C57BL/6, machos com 4 semanas de idade, foram infectados por via i.d. com inóculo de 10⁶ PFU de CHIKV em volume de 50 µL, enquanto que camundongos controle negativo, Mock, receberam solução salina em mesmo volume e via. **(A)** Tratamento com Ac2-26 por via de administração sistêmica (i.p.), aplicado diariamente (150 µg/camundongo) desde 1 h prévia à infecção. No 7º d.p.i. os animais passaram por avaliação nociceptiva, em seguida foram eutanasiados e coletado tecido sinovial, coxim plantar e articulação tibiofemoral para experimentos específicos. **(B)** Tratamento com Ac2-26 por via de administração local (i.a.), aplicado 3 h pós-infecção e no 3º d.p.i.. No 1º, 3º e 7º d.p.i. os animais passaram por avaliação nociceptiva e no último ponto temporal foram eutanasiados e coletado coxim plantar para ensaio ELISA.

3.5 Hipernocicepção mecânica

Para aferir hipernocicepção foi utilizado um analgesímetro digital Von Frey (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil) capaz de avaliar a sensibilidade do animal ao estímulo mecânico.

Primeiro os camundongos foram acondicionados em caixas de contenção sobre uma tela metálica de sustentação, por 30 a 40 min, até que seu comportamento exploratório tenha diminuído consideravelmente. Após esse período de adaptação é iniciado o teste, que consiste na aplicação de uma ponteira romba na superfície plantar da pata posterior direita do camundongo, até que seja induzida a flexão da articulação do seu joelho e ocorra uma resposta de retirada de pata. A intensidade

da força aplicada sob a pata é registrada pelo analgesímetro Von Frey, de modo que quanto mais alto for esse valor recordado, maior foi a força necessária para promover o movimento de retirada de pata do camundongo, indicando que ele não sente dor, já o registro de valores baixos de limiar de retirada de pata indicam hipernocicepção. Para cada camundongo foram obtidos três valores de limiar de retirada de pata e o resultado da avaliação foi expresso como a média desses registros em força (g) (Sachs *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2005).

3.6 Citometria de fluxo

Conforme tempo estabelecido na cinética de infecção, o tecido sinovial da articulação tibiofemoral dos camundongos foi coletado após eutanásia dos camundongos e incubado por 1 h a 37 °C e agitação constante em 100 µL de 10 mg / mL de colagenase VIII (Sigma-Aldrich) em meio DMEM, para digestão enzimática do tecido. As células foram, então, isoladas com auxílio de um filtro *Cell Strainer* 70µm, em seguida foram centrifugadas (2000 rpm / 10 min / 4 °C) e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuscitado em 100 µL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) 1X / BSA 1 %, sendo 10 µL dessa suspensão diluído em Turk para contagem do número de células totais por amostra em câmara de *Newbauer* e 90 µL plaqueado em placa de 96 poços.

Para a preparação das células para marcação, inicialmente a placa foi centrifugada (1600 rpm / 10 min / 4 °C), sobrenadante descartado e, então, foi bloqueada com Fc-block 10 µL / poço por 30 min ao abrigo da luz e temperatura a 4 °C. Em sequência, a placa foi lavada com 100 µL de PBS 1X / BSA 1% por poço, centrifugada (1600 rpm / 10 min / 4 °C), sobrenadante descartado e adicionado mix de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para marcação de subpopulações de fibroblastos sinoviais (10 µL / poço), conforme descrito: anti-CD90 em APC; anti-FAP em V421; anti-RANKL em PE; anti-CD45 em FITC. Todos os anticorpos usados foram adquiridos da BD Biosciences e preparados seguindo recomendações do fabricante.

Adicionado mix, a placa foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e temperatura a 4 °C, lavada com 100 µL de PBS 1X / BSA 1 % por poço, centrifugada (1600 rpm / 10 min / 4 °C), sobrenadante descartado e fixada por 30 min com 100 µL / poço de paraformaldeído 2 % em PBS 1X. Por fim, a placa foi novamente centrifugada (1600

rpm / 10 min / 4 °C), sobrenadante descartado, adicionado 200 µL / poço de PBS 1X / BSA 1 % para ressuspensão das células e, então, passagem dessas amostras para tubos de fundo redondo específicos para citômetro. A leitura foi realizada em um citômetro de fluxo (FACScanto II, BD Biosciences, USA) no dia seguinte à marcação e os dados adquiridos foram avaliados no programa FlowJo v10.7.1 (Tree Star Company).

3.7 ELISA

Foram quantificados os níveis da quimiocina CCL2 no coxim plantar posterior direito dos animais e níveis da citocina IL-6 também do coxim e em sobrenadante de cultura primária de FLS, através de ensaios ELISA. Após coleta, utilizando um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific Pennsylvania, USA), as amostras de coxim foram homogeneizadas em solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride; 0,1 mM benzethonium chloride; 10 mM EDTA, 20 KI aprotinina A) na proporção de 2 mL de solução para cada 0,1 g de tecido. Em sequência, o homogenato obtido passou por centrifugação (10.000 rpm / 15 min / 4 °C) e o sobrenadante resultante foi coletado e diluído (1:3) em PBS 1X / BSA 1%. O sobrenadante de cultura não necessita de processamento prévio.

Foram utilizados kits de anticorpos (R&D Systems, EUA) e seguido o protocolo recomendado pelo fabricante. Assim, inicialmente placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA) foram sensibilizadas com 100 µL / poço dos anticorpos de captura, eluídos em PBS, para a citocina ou quimiocina específica. Em seguida, as placas foram acomodadas ao abrigo da luz, em temperatura de 4° C, até o dia posterior. As placas então foram lavadas com *Wash Buffer* (0,05 % Tween 20 em PBS) e bloqueadas por 1 h em temperatura ambiente com 300 µL / poço de solução PBS 1X / BSA 1 %, culminando no bloqueio de sítios livres. Após essa 1 h, as placas foram novamente lavadas com *Wash Buffer* e, então, foram adicionados anticorpos de cada curva padrão diluídos em PBS 1X / BSA 1 %, conforme recomendações do fabricante, além de ser pipetado as amostras devidamente diluídas, ambos em volume de 100 µL / poço. Posteriormente, as placas foram acomodadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 2 h e em sequência adicionado os anticorpos específicos de detecção (100 µL / poço), conjugados à biotina, e eluídos em PBS 1X / BSA 1 %. As placas

ficaram incubadas sob agitação leve, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 2 h, com posterior lavagem utilizando *Wash Buffer* e final detecção com estreptavidina (100 µL / poço) conjugada à peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem – 1:200), revelada utilizando OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma-Aldrich, EUA) eluído em tampão fosfato citrato de sódio 0,4 M (100 µL / poço). Após 30 minutos a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M e as placas foram lidas em um comprimento de onda de 490 nanômetros (nm) por um espectrofotômetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices).

Os resultados foram expressos como picograma (pg) de citocina ou quimiocina por mL de tecido, calculados com base na equação da reta de regressão linear da curva padrão respectiva.

3.8 Análise histopatológica

Conforme tempo estabelecido na cinética de infecção, a região da articulação tibiofemoral dos camundongos eutanasiados foi coletada e, então, fixada em formol 4 % v/v por 48 h, momento em que foram transferidas para solução de EDTA 14 % p/v. Essa solução foi trocada a cada três dias e as amostras mantidas por aproximadamente 30 dias para a desmineralização óssea. Uma vez desmineralizados, os tecidos foram processados, incluídos em parafina, cortados, montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), como descrito por Costa e colaboradores (Costa *et al.*, 2015).

Foi então executada análise histopatológica por sistema de escore seguindo os parâmetros: gravidade da hiperplasia sinovial (0: sem alterações; 1: hiperplasia focal; 2: hiperplasia extensa; 3: hiperplasia generalizada), intensidade de infiltrado inflamatório (0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso; 4: generalizado) e grau de reabsorção óssea (0: sem alterações; 1: escassas lacunas de reabsorção; 2: área significativa de perda óssea/cartilagem).

Em seguida, as lâminas foram fotografadas utilizando um microscópio Motic (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão) para a obtenção de imagens representativas. Essas imagens foram feitas em aumento menor de 10x ou no aumento maior de 40x, com escalas que variaram de 200 micrômetros (µm) a 50 µm nos respectivos aumentos.

3.9 Cultura primária de FLS

No ambiente de fluxo laminar procedeu-se a coleta do tecido sinovial da articulação tibiofemoral de camundongos WT da linhagem C57BL/6. Todo o processo de dissecação foi realizado com instrumentos constantemente embebidos em álcool 70 %, garantindo um controle rigoroso contra possíveis contaminações. As amostras coletadas foram, então, acondicionadas em tubos estéreis contendo 500 µL de colagenase VIII em meio DMEM (10 mg / mL), sendo em seguida incubadas por 1 h a 37 °C, em agitação constante. Ao término do período de incubação, os tubos foram vortexados para liberação das células, centrifugados (1200 rpm / 10 min / 4 °C) e o sobrenadante descartado. O pellet resultante foi ressuspensão em 7 mL de meio DMEM suplementado com 20 % de SFB e 1 % de penicilina, e, então, transferido para uma garrafa de cultivo celular T25 com tampa ventilada. Essa garrafa foi mantida em uma estufa de cultura umidificada (37 °C / 5 % CO₂) e quando a confluência de suas células atingiu valores entre 80 % e 100 %, elas foram tripsinizadas e transferidas para uma nova garrafa.

Para obtenção de uma cultura pura de FLS, o processo de tripsinização foi realizado durante as primeiras passagens por um período de exposição máximo de 5 min. Esse procedimento foi cuidadosamente planejado para permitir que os macrófagos sinoviais permanecessem aderidos à garrafa de cultura, enquanto que as células de interesse pudessem ser transferidas para uma nova garrafa. Essa abordagem nos proporcionou uma cultura homogênea de FLS.

Com a cultura estabelecida, as garrafas T75 com confluência acima de 80 % foram submetidas à tripsinização. As células tripsinizadas foram então plaqueadas em placas de 24 poços, com cada poço contendo 1×10^5 células em 300 µL de meio DMEM suplementado com 7% de SFB. Após 48 h do plaqueamento as células já se dispunham aderidas em uma monocamada com confluência de 85 a 90 % por poço e foi iniciado a experimentação.

3.10 Modelo experimental *in vitro*

Para padronização da infecção pelo CHIKV da cultura primária de FLS murinos, essas células já plaqueadas foram incubadas com o vírus em três diferentes multiplicidades de infecção (MOI), sendo elas de 0,01; 0,1 e 1, em volume de 300 µL por poço de meio DMEM. Após 1 h de adsorção viral o sobrenadante foi removido e

então adicionado 300 µL de novo meio DMEM. Poços controle negativo não foram incubados com o vírus, receberam apenas 300 µL de meio DMEM em todas as etapas experimentais. As placas foram mantidas em uma estufa de cultura umidificada (37 °C / 5 % CO₂) durante todo o período de experimentação.

O sobrenadante dos poços foi coletado em três momentos distintos: 12 h, 24 h e 48 h pós-infecção, com o propósito de realizar o ensaio ELISA para detectar a citocina IL-6. Adicionalmente, a viabilidade celular dos poços foi avaliada por meio do ensaio MTT.

Após padronização da infecção, foi avaliada a resposta celular de FLS à infecção pelo CHIKV na presença de Ac2-26. Para isso, foram utilizadas concentrações de 10 µM e 50 µM do peptídeo em 300 µL / poço de meio DMEM. O desenho experimental foi centralizado na infecção das células plaqueadas pelo CHIKV em MOI de 0,1, após período de adsorção viral de 1 h o conteúdo das placas foi desprezado e adicionado 300 µL / poço do peptídeo nas concentrações determinadas em meio DMEM. Poços controle negativo, não infectados, e poços controle positivo, infectados não tratados, receberam apenas 300 µL de meio DMEM. As placas foram mantidas em uma estufa de cultura umidificada (37 °C / 5% CO₂) durante todo o período de experimentação.

Novamente o sobrenadante dos poços foi coletado em três momentos distintos: 12 h, 24 h e 48 h pós-infecção, com o propósito de realizar ensaio ELISA para detecção dos níveis da citocina IL-6. Após coleta de sobrenadante, foi determinada carga viral da cultura de FLS através de técnica de RT-qPCR.

3.11 Ensaio MTT

Para avaliação da viabilidade celular foi executado ensaio colorimétrico com base na redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e consequente formação de cristais de formazan roxo por células metabolicamente ativas.

Logo após coleta de sobrenadante das placas, foram pipetados 90 µL de meio DMEM por poço, seguido de 10 µL de reagente MTT por poço, para que, então, as placas fossem incubadas em estufa de cultura umidificada (37 °C / 5 % CO₂) por 1 h e 30 min. Em seguida, foi descartado sobrenadante, adicionado 100 µL de DMSO

por poço e homogeneizado para leitura em comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices).

A absorbância obtida é diretamente proporcional à viabilidade celular, a qual é calculada comparando as absorbâncias das monocamadas, tanto tratadas, quanto não tratadas, em relação à média das absorbâncias registradas nos poços controle. Dessa forma, os valores plotados representam a porcentagem de viabilidade celular em relação aos poços controle de cada ensaio.

3.12 Análise por RT-qPCR

Para determinação da carga viral de CHIKV na cultura primária desenvolvida, inicialmente as amostras de FLS foram submetidas à extração de RNA por kit *QIAamp_Viral RNA Mini Kit*, seguindo especificações do fabricante. Em seguida, a reação de RT-qPCR – *one step* foi performada e utilizado Kit Molecular ZC D-TIPAGEM Bio-Manguinhos para detecção do CHIKV, através de *primer* e sondas fornecidas pelo mesmo.

Após amplificação, o número de cópias de CHIKV foi determinado pela leitura de absorbância em equipamento Qubit, através da relação da absorbância obtida das amostras aos valores de absorbância e número de cópias obtidas pela curva padrão. A curva padrão apresentou seis pontos, diluídos serialmente na fração de 1:10, sendo o ponto inicial correspondente à 4×10^{17} números de cópias de vírus CHIKV. Para identificação do número de cópias em cada ponto da curva padrão em relação à absorbância obtida, foi seguida equação:

$$\text{Número de cópias} = \frac{A}{TG \times PN} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde 'A' representa a absorbância da amostra padrão (ng), 'TG' o tamanho do genoma viral (pb) e 'PN' o peso da ligação nucleotídica no RNA (g / mol), como previamente estabelecido (BIOSynthesis, 2021).

3.13 Análise estatística

Foi realizada análise de normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk e para análise estatística dos ensaios de dados paramétricos foi realizado o teste One-Way ou Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey ou Sidak, determinando

diferenças entre as médias dos grupos avaliados. Quanto aos dados não paramétricos, o teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, com análises entre as médias dos grupos avaliados.

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) para cada grupo e todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 8 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Diferenças foram consideradas estatísticas quando $p < 0,05$ (assinalados com *).

4. RESULTADOS

4.1. A ausência de ANXA1 provoca maior hiperplasia na camada íntima da membrana sinovial da articulação tibiofemoral de animais infectados pelo CHIKV.

Com objetivo de investigar a possível influência da proteína ANXA1 sob o ambiente articular durante a cinética de infecção pelo CHIKV, foram realizadas análises histopatológicas em animais nocaute para a proteína. As alterações teciduais foram examinadas por um patologista experiente, de modo cego, e, posteriormente, foram expressas em escore específico.

Os animais Mock, tanto WT, quanto ANXA1^{-/-}, demonstraram morfologia característica de uma articulação saudável, com predomínio de tecido adiposo na camada subíntima da membrana sinovial e fibroblastos e macrófagos sinoviais dispostos em camada única na camada íntima da membrana sinovial, sendo ausente infiltrado inflamatório e eventos de reabsorção óssea (Figura 12). Já quanto aos animais infectados, quando no 3^o d.p.i., os camundongos ANXA1^{-/-} demonstraram um perfil de hiperplasia generalizada na camada íntima da membrana sinovial, que contrasta com hiperplasia em menor grau, extensa, em animais WT (Figura 12). Já no 7^o d.p.i., os camundongos ANXA1^{-/-} infectados apresentaram uma diminuição na hiperplasia sinovial em relação ao 3^o d.p.i., assemelhando-se a camundongos WT, que demonstraram um grau de hiperplasia em modo focal (Figura 12). Além disso, em ambos os grupos infectados e tempos avaliados não foi observado presença de infiltrado inflamatório e de reabsorção óssea nos cortes histológicos.

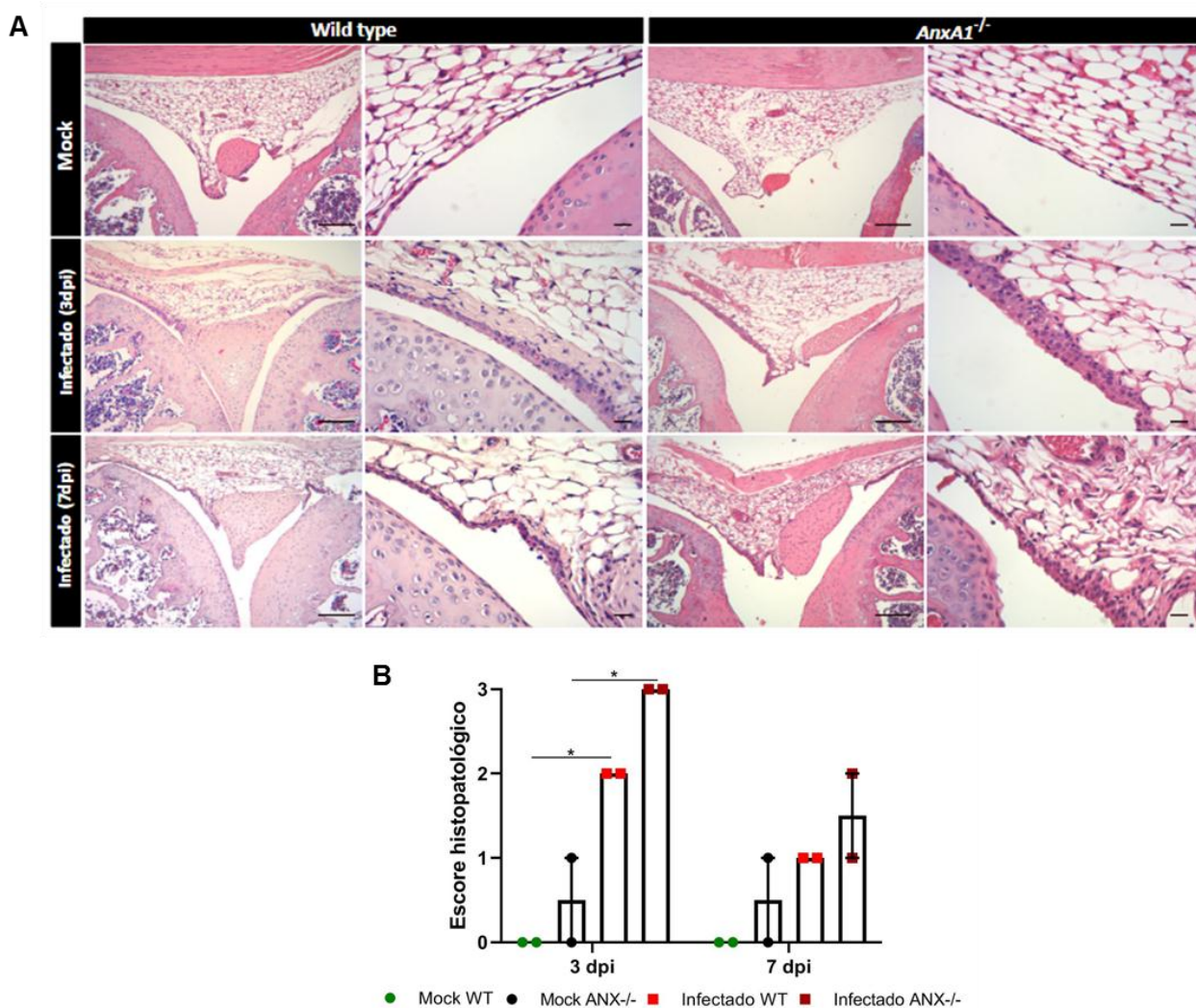


Figura 12. Papel da ANXA1 sob a arquitetura articular sinovial em contexto de infecção pelo CHIKV.

Camundongos WT e ANXA1^{-/-} da linhagem BALB/c, machos ou fêmeas, com idades de 4 semanas, foram infectados na pata traseira direita pelo CHIKV, em injeção i.d. de 1×10^6 PFU/50 μ L. Os animais controles não infectados, Mock, receberam apenas injeção i.d. de 50 μ L de solução salina. Os camundongos foram eutanasiados no 3^o e 7^o dia pós-infecção e a articulação tibiofemoral coletada para processamento e análise histopatológica. **(A)** Imagens representativas dos cortes histológicos organizadas em prancha. Coloração H&E em aumento de 10x com escala de 200 μ m e aumento de 40x com escala de 50 μ m. **(B)** Representação gráfica do escore histopatológico referente a alterações no tecido sinovial. Cada grupo experimental foi composto por 2 animais e a avaliação estatística feita utilizando ANOVA two way e teste Sidak, * $p < 0.05$.

4.2. Ac2-26 em estratégia de tratamento por administração sistêmica reduz parâmetro inflamatório plantar, apesar de não reverter quadro de hipernocicepção associado à infecção pelo CHIKV.

Sendo demonstrada influência da proteína ANXA1 sob a fisiopatologia articular durante infecção pelo CHIKV, foi implementada estratégia de tratamento por via de administração sistêmica (i.p.) utilizando o peptídeo mimético Ac2-26.

Em avaliação nociceptiva no 7^o d.p.i., camundongos do grupo Mock apresentaram valores altos de limiar mecânico de retirada de pata, indicando ausência de hipernocicepção (Figura 13A). Em contrapartida, camundongos infectados, tratados ou não, demonstraram valores de limiar relativamente baixo no mesmo ponto de tempo, indicando presença de estímulo hipernociceptivo nesses grupos, o que não é controlado pelo tratamento por via de administração sistêmica com Ac2-26 (Figura 13A).

Ainda para o 7^o d.p.i., com avaliação dos níveis de CCL2 no coxim plantar traseiro direito, foi verificado um aumento expressivo da presença da quimiocina no tecido de animais infectados em relação ao grupo controle Mock, que mostrou valor mínimo (Figura 13B). Além disso, o tratamento com Ac2-26 em modelo sistêmico promoveu uma diminuição na concentração de CCL2 tecidual em relação aos níveis da quimiocina presente em camundongos infectados não tratados (Figura 13B).

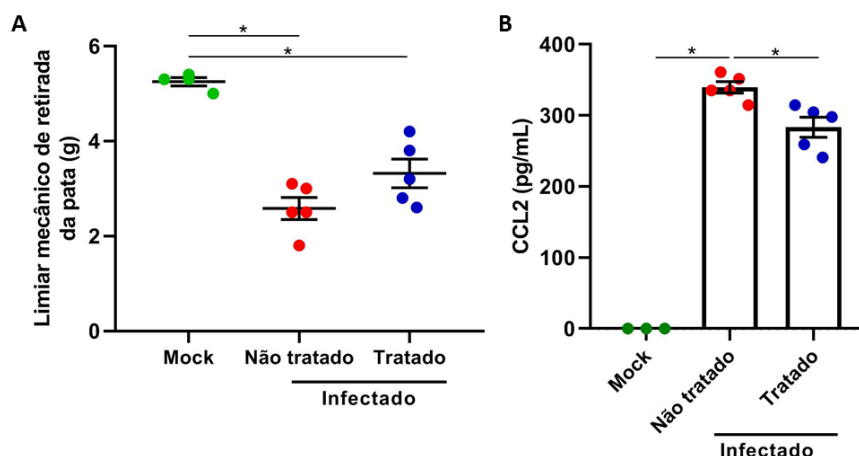


Figura 13. Impacto do tratamento por via de administração sistêmica com Ac2-26 no modelo animal de infecção pelo CHIKV em processos inflamatórios e nociceptivos.

Camundongos WT da linhagem C57BL/6, machos, com idades de 4 semanas, foram infectados na pata traseira direita pelo CHIKV, em injeção i.d. de 1×10^6 PFU/50 μ L. Os animais controle negativo não infectados, Mock, receberam apenas injeção i.d. de 50 μ L de solução salina. Animais controle positivo, infectados não tratados, receberam apenas veículo do tratamento, enquanto que animais infectados tratados receberam dose diária (150 μ g/100 μ L) de Ac2-26 por via i.p.. No 7^o d.p.i. os camundongos passaram por teste nociceptivo, em seguida foram eutanasiados e o coxim plantar direito traseiro coletado para processamento e análise por ensaio ELISA. **(A)** Valores de limiar mecânico de retirada de pata obtidos em força (g) pelo desafio com Von Frey eletrônico **(B)** Nível da quimiocina CCL2 no coxim plantar, mensurado através de ensaio ELISA e expresso em pg/mL de tecido processado. Cada grupo experimental foi composto por 5 animais e a avaliação estatística feita utilizando ANOVA *one way* e teste de Tukey, * $p < 0.05$.

4.3. Ac2-26 em estratégia de tratamento por via de administração sistêmica demonstra participação no controle da hiperplasia celular sinovial e expressão do ligante RANKL por FLS em camundongos infectados pelo CHIKV.

A fim de caracterizar o ambiente articular tibiofemoral sob eventos da infecção pelo CHIKV e modelo de tratamento por via de administração sistêmica com Ac2-26, foi executado experimento de citometria de fluxo com um painel desenhado para identificação de subpopulações de fibroblastos sinoviais e seu perfil quanto à expressão do ligante RANKL no tecido sinovial, quando no 7^o d.p.i. pelo CHIKV. A estratégia de *gates* desempenhada pode ser visualizada na Figura 14.

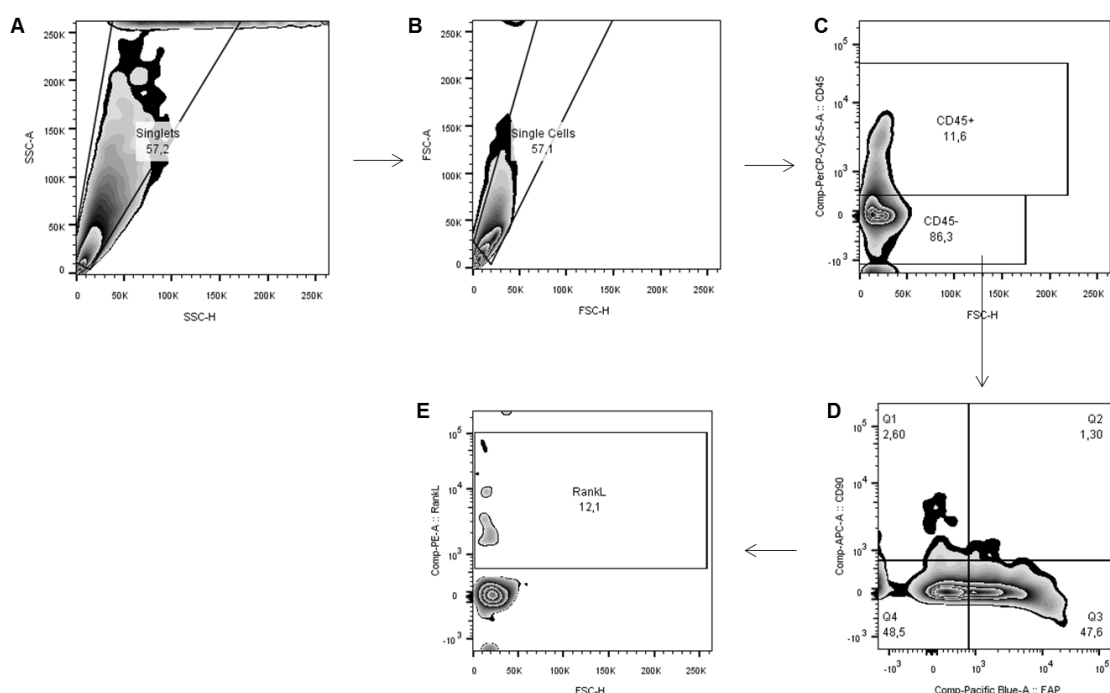


Figura 14. Estratégia de *gates*.

Painel formado por imagens representativas da estratégia de *gates* empregada na análise da leitura de citometria de fluxo de amostras de tecido sinovial tibiofemoral de animais da linhagem C57BL/6 infectados pelo CHIKV na pata direita em injeção i.d. de 1×10^6 PFU/50 μ L. Foi executado separação de singlets (A) e single cells (B), para determinação de população de células em marcação para CD45 (C). Dentro da população de células CD45 negativas foram separadas as subpopulações de FLS por marcação de CD90 e FAP (D). Por fim, dentro de cada subpopulação de FLS determinada, foi definida a marcação positiva pra RANKL (E). Imagens obtidas através do programa FlowJo v10.7.1 (Tree Star Company).

Em análise do número de células totais, foi identificada hiperplasia sinovial em animais infectados não tratados, apontada pelo aumento da subpopulação de FLS CD90-FAP+ em relação ao observado para animais do grupo Mock (Figura 15C). Camundongos infectados e tratados com Ac2-26, entretanto, mostraram população de FLS CD90-FAP+ mais semelhante em número de células ao encontrado para animais do grupo Mock, indicando influência do tratamento sob eventos de hiperplasia sinovial (Figura 15C). Já para as subpopulações de FLS CD90+FAP+ e CD90FAP-, apesar da tendência leve de aumento de número de células totais para animais infectados não tratados, não houve alterações significativas entre os grupos avaliados (Figura 15A-B).

Já quanto ao perfil de expressão de RANKL, foi observado um aumento no número de células totais positivas para o ligante em todas as subpopulações de FLS

analisadas para animais infectados pelo CHIKV e não tratados, em relação a animais Mock (Figura 15D-F). Além disso, o tratamento com Ac2-26 teve efeito sob a expressão de RANKL, indicada pela diminuição significativa de células positivas para o ligante em todas as subpopulações de FLS analisadas de animais infectados e tratados, em relação às mesmas populações em animais infectados, mas não tratados com Ac2-26 (Figura 15D-F). Em suma, de modo geral o perfil populacional apresentado pelos camundongos infectados e tratados foi, em número de células total, semelhante ao observado para animais Mock (Figura 15D-F).

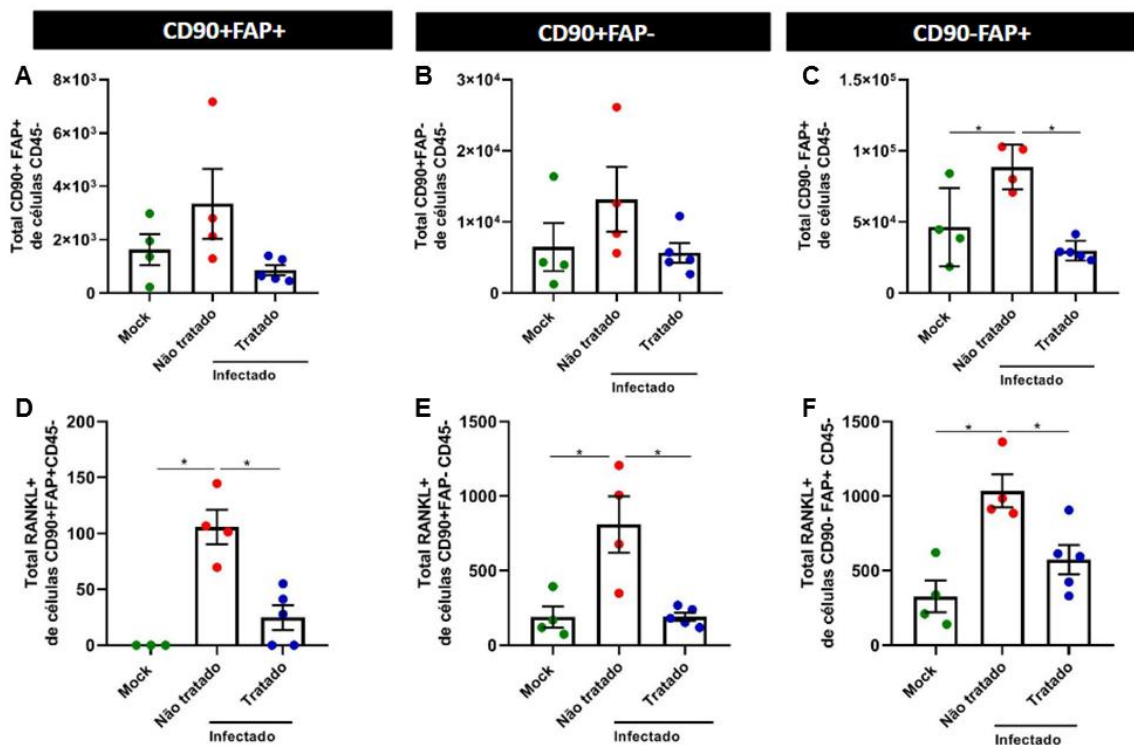


Figura 15. Efeito do tratamento com Ac2-26 em modelo de via de administração sistêmica sob a hiperplasia celular sinovial e expressão do ligante RANKL por FLS associado ao modelo animal de infecção por CHIKV.

Camundongos WT da linhagem C57BL/6, machos, com idade de 4 semanas, foram infectados na pata traseira direita pelo CHIKV, em injeção i.d. de 1×10^6 PFU/50 μ L. Os animais controle negativo não infectados, Mock, receberam apenas injeção i.d. de 50 μ L de solução salina. Animais controle positivo, infectados não tratados, receberam apenas veículo do tratamento, enquanto que animais infectados tratados receberam dose diária (150 μ g/100 μ L) de Ac2-26 por via i.p.. No 7^o d.p.i. os animais foram eutanasiados e o tecido sinovial tibiofemoral coletado para processamento e análise por citometria de fluxo. Foram analisadas marcações para as subpopulações de FLS (A) CD90+FAP; (B) CD90+FAP-; (C) CD90-FAP+, dentro de células CD45+, além da expressão do ligante RANKL por cada uma dessas subpopulações identificadas (D-F), ambos expressos como número total de células para cada população específica. Cada grupo experimental foi composto por 5 animais e a avaliação estatística feita utilizando ANOVA *one way* e teste de Tukey, * $p < 0.05$.

4.4. Ac2-26 em estratégia de tratamento por via de administração local influencia perfil nociceptivo e inflamatório de animais infectados pelo CHIKV.

Identificada participação da ANXA1 na fisiopatologia articular da infecção pelo CHIKV e observado efeitos do tratamento sistêmico com Ac2-26 sob esse ambiente, foi explorada ação do peptídeo mimético estrategicamente direcionado na articulação dos camundongos, em modelo de tratamento por via de administração local intra-articular.

Durante cinética de infecção e tratamento, os camundongos passaram por avaliação nociceptiva no 1º, 3º e 7º d.p.i., além de avaliação basal pré-infecção no tempo zero. Foram observados valores altos de limiar mecânico de retirada de pata, crescentes ao longo do tempo, para animais controle negativo, Mock, o que indica ausência de estímulo nociceptivo em todos os tempos avaliados para o grupo (Figura 16A). Já para animais infectados e não tratados, os valores de limiar são baixos em relação ao controle Mock, indicando que esses animais passam por hipernocicepção durante todo período investigado de infecção pelo CHIKV (Figura 16A). Considerando os animais infectados e tratados, foi observado valores de limiar intermediários em relação aos controles no 1º e 3º d.p.i., o que indica que os camundongos apresentaram caráter nociceptivo, mas de menor intensidade ao observado para animais infectados que não receberam o tratamento com Ac2-26 em estratégia de administração local (Figura 16A). Já no último ponto temporal avaliado, os animais infectados tratados passaram a demonstrar valores de limiar semelhante aos daqueles que não receberam tratamento, sendo associada à hipernocicepção característica da infecção (Figura 16A).

O parâmetro inflamatório relacionado ao nível da citocina IL-6 no coxim plantar foi avaliado no 7º d.p.i., através de ensaio ELISA. Identificamos um aumento na concentração de IL-6 em animais infectados pelo CHIKV, o que é revertido pelo tratamento com Ac2-26 em estratégia local (Figura 16B). Esses animais, infectados e tratados, mostraram níveis semelhantes da citocina em relação a animais não infectados, Mock (Figura 16B).

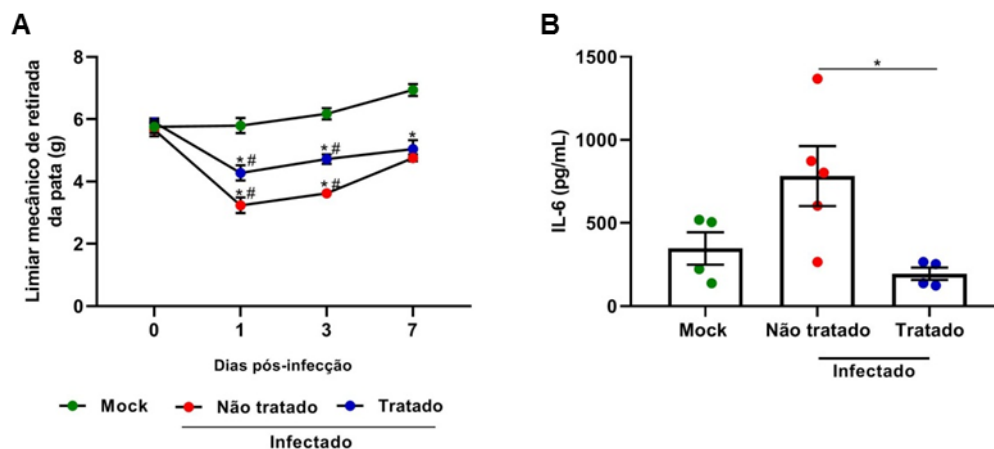


Figura 16. Modulação do perfil Inflamatório e nociceptivo por Ac2-26 em modelo de tratamento por via de administração local para animais infectados pelo CHIKV.

Camundongos WT da linhagem C57BL/6, machos, com idade de 4 semanas, foram infectados na pata traseira direita pelo CHIKV, em injeção i.d. de 1×10^6 PFU/50 μ L. Os animais controle negativo não infectados, Mock, receberam apenas injeção i.d. de 50 μ L de solução salina. Animais controle positivo, infectados não tratados, receberam apenas veículo do tratamento, enquanto que animais infectados tratados receberam 3 hpós-infecção e no 3º d.p.i. Ac2-26 (10 μ M /10 μ L) por via i.a.. No 1º, 3º e 7º d.p.i. os camundongos passaram por teste nociceptivo, além da avaliação basal no tempo 0, e foram eutanasiados no 7º d.p.i. para coleta do coxim plantar direito, posterior processamento e análise por ensaio ELISA. **(A)** Valores de limiar mecânico de retirada de pata obtidos em força (g) pelo desafio com Von Frey eletrônico ao longo da cinética de infecção. Os grupos infectados foram considerados significativos em relação ao grupo mock quando $*p < 0.05$, já o grupo infectado tratado foi considerado significativo em relação ao grupo infectado não tratado quando $\#p < 0.05$. **(B)** Nível da citocina IL-6 no coxim plantar, mensurado através de ensaio ELISA e expresso em pg/mL de tecido processado, $* p < 0.05$. Cada grupo experimental foi composto por 5 animais e a avaliação estatística feita utilizando ANOVA one way e teste de Tukey.

4.5. Infecção de cultura primária de FLS pelo vírus CHIKV tem MOI ótimo de 0,1 para resposta inflamatória e viabilidade celular.

Para investigar parâmetros intrínsecos de FLS da articulação tibiofemoral em resposta à infecção pelo CHIKV, iniciamos uma cultura primária com células sinoviais derivadas de camundongos C57BL/6 e, quando pura para a célula de interesse, padronizamos a infecção *in vitro* por análise de parâmetro inflamatório e viabilidade celular.

Através de ensaio ELISA, obtivemos os níveis da citocina IL-6 no sobrenadante da cultura de FLS infectada por diferentes MOIs de CHIKV. Nos pontos temporais avaliados, 12 h, 24 h e 48 h pós-infecção, o grupo controle, o qual não foi infectado, mostrou níveis basais da citocina (Figura 17A-C). Para infecção em MOI de 0,01, o

perfil identificado foi semelhante ao observado para poços controle, com concentração baixa da citocina em ambos os tempos avaliados (Figura 17A-C). Quanto aos MOI de 0,1 e 1, foi observado relativamente aos poços controle uma concentração elevada de IL-6 em resposta à infecção, de modo que em MOI 1 os valores foram significativamente superiores ao de 0,1 em todos pontos de tempo (Figura 17A-C).

Em análise de viabilidade celular, o ensaio de MTT não indicou alterações entre os MOIs testados no período de 12 h e 24 h pós-infecção em relação à porcentagem média obtida para poços controle nesse mesmo ponto temporal (Figura 17D-E). No ponto de 24 h pós-infecção houve o início de uma tendência de diminuição de viabilidade celular diretamente proporcional ao aumento do fator MOI, que se tornou significativa no ponto de 48 h (Figura 17E-F). Nesse tempo pós-infecção, poços infectados em MOI de 0,01 mantiveram valores de viabilidade celular elevados em relação aos poços controle não infectados (Figura 17F). Entretanto, poços em MOI superiores, 0,1 e 1, tiveram uma queda semelhante de viabilidade celular no ponto de 48 h pós-infecção, de modo significativo em relação ao controle negativo não infectado e ao MOI de 0,01 (Figura 17F).

Assim, esses resultados em conjunto indicam o MOI de 0,1 como mais adequado para infecção de FLS pelo CHIKV, por ser o menor MOI avaliado a apresentar diferenças significativas em relação ao controle negativo não infectado em ambos os parâmetros explorados.

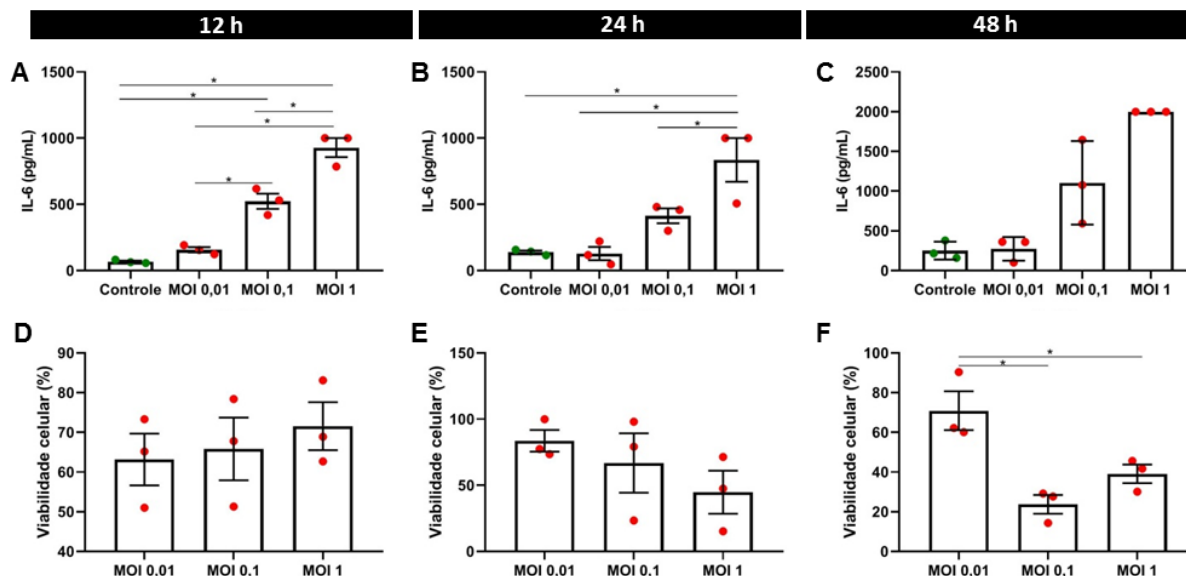


Figura 17. Dinâmica de viabilidade celular e produção de IL-6 em cultura primária de FLS infectada pelo CHIKV ao longo do tempo.

Foi utilizado, na sétima passagem celular, cultura de FLS derivada da articulação tibiofemoral de camundongos C57BL/6 com 4 semanas de idade. Foram plaqueadas 1×10^5 células por poço e utilizado MOI de 0,01; 0,1; 1 de vírus CHIKV por poço, em triplicata, enquanto que poços controle receberam apenas meio DMEM. Após 1 h do momento de infecção, tempo de adsorção viral, o sobrenadante foi removido e então adicionado 300 μ L de meio DMEM aos poços. As placas foram mantidas em condição padrão de estufa de cultura umidificada e 12, 24 e 48 h pós-infecção o sobrenadante foi coletado para ensaio ELISA e, em seguida, as células passaram por desafio de viabilidade celular. Nível da citocina IL-6 no sobrenadante celular mensurado através de ensaio ELISA e expresso em pg/mL no tempo de 12 h (A), 24 h (B) e 48 h (C) pós-infecção. A viabilidade celular foi avaliada por meio de ensaio MTT para os tempos de 12 h (D), 24 h (E) e 48 h (F) e expressa em porcentagem de viabilidade celular dos poços infectados em relação à média encontrada para poços controle em cada tempo avaliado. Cada grupo experimental apresentou-se em triplicata e a avaliação estatística feita utilizando ANOVA one way e teste de Tukey para distribuições normais e para dados não paramétricos (F), foi utilizado teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, * $p < 0.05$.

4.6. Modulação do tratamento *in vitro* com Ac2-26 sob a resposta inflamatória em FLS infectados pelo CHIKV mostra-se concentração e tempo dependentes.

Padronizada infecção *in vitro* de FLS primários pelo CHIKV com MOI de 0,1, buscamos avaliar o perfil inflamatório dessas células em resposta ao tratamento com Ac2-26 no contexto de infecção.

O nível de citocina IL-6 foi mensurado por ensaio ELISA nos pontos temporais avaliados, 12h e 48 h pós-infecção. Para 12 h, identificamos um aumento significativo da produção da citocina em poços infectados não tratados, em relação a poços controle não infectados (Figura 18A). Em contraste, poços infectados e tratados, tanto com 10 μ M, quanto com 50 μ M de Ac2-26, mostraram níveis

semelhantes aos dos poços controle não infectados para a citocina pró-inflamatória (Figura 18A). Já no período de 48 h pós-infecção, foi mantido altos níveis de IL-6 em poços infectados não tratados em relação ao controle negativo, semelhante ao identificado para poços infectados e tratados com 10 μ M de Ac2-26 (Figura 18B). Aqueles poços infectados e tratados com 50 μ M de Ac2-26, em contrapartida, mantiveram caráter semelhante ao identificado aos poços controle negativo nesse período de 48 h pós-infecção, caracterizado por baixo nível da citocina IL-6 (Figura 18B).

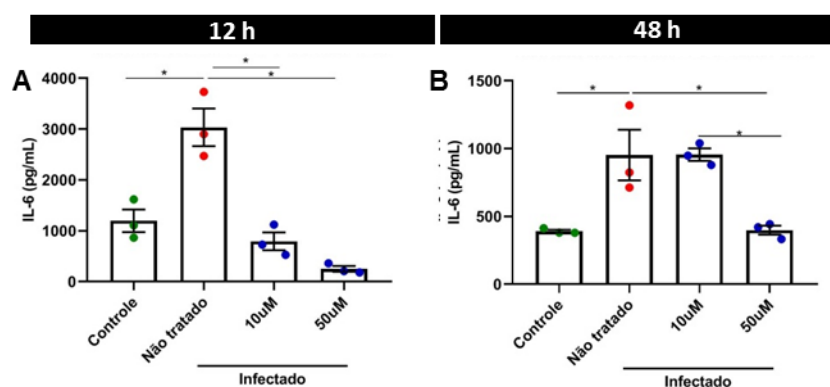


Figura 18. Efeito do tratamento com Ac2-26 nos níveis de IL-6 do sobrenadante celular de cultura primária de FLS infectada pelo CHIKV.

Foi utilizado, na oitava passagem celular, cultura de FLS derivada da articulação tibiofemoral de camundongos C57BL/6 com 4 semanas de idade. Foram plaqueadas 1×10^5 células por poço e utilizado MOI de 0,1 de vírus CHIKV por poço infectado, em triplicata, enquanto que poços controle receberam apenas meio DMEM. Após 1 h do momento de infecção, tempo de adsorção viral, o sobrenadante foi removido e então adicionado 300 μ L de meio DMEM aos poços controle e infectado não tratado, enquanto que os poços tratados receberam respectivos tratamentos de 10 μ M ou 50 μ M de Ac2-26 em 300 μ L de meio DEMEM. As placas foram mantidas em condição padrão de estufa de cultura umidificada e 12 e 48 h pós-infecção o sobrenadante foi coletado para ensaio ELISA. O nível da citocina IL-6 no sobrenadante celular, mensurado através de ensaio ELISA, foi expresso em pg/mL no tempo de 12 h (A) e 48 h (B) pós-infecção. Cada grupo experimental apresentou-se em triplicata e a avaliação estatística feita utilizando ANOVA one way e teste de Tukey, * p < 0.05.

4.7. Tratamento *in vitro* com Ac2-26 em cultura primária de FLS infectada pelo CHIKV não demonstra interferir na carga viral.

Uma vez demonstrado influência do tratamento *in vitro* com Ac2-26 sob cultura primária de FLS infectada pelo CHIKV, quanto à expressão do mediador IL-6, foi avaliado a influência do mesmo em relação à carga viral nos tempos de 12, 24 e 48 h pós-infecção.

O título viral, quantificado por meio de RT-qPCR, em ambos os tempos avaliados não demonstrou diferença significativa para os grupos de células infectadas e tratadas com Ac2-26 em relação ao grupo de células infectadas e não tratadas (Figura 19). Além disso, também não se observou alterações significativas entre os grupos que receberam diferentes concentrações de Ac2-26, 10 ou 50 μM , para a carga viral quantificada em ambos os tempos avaliados (Figura 19).

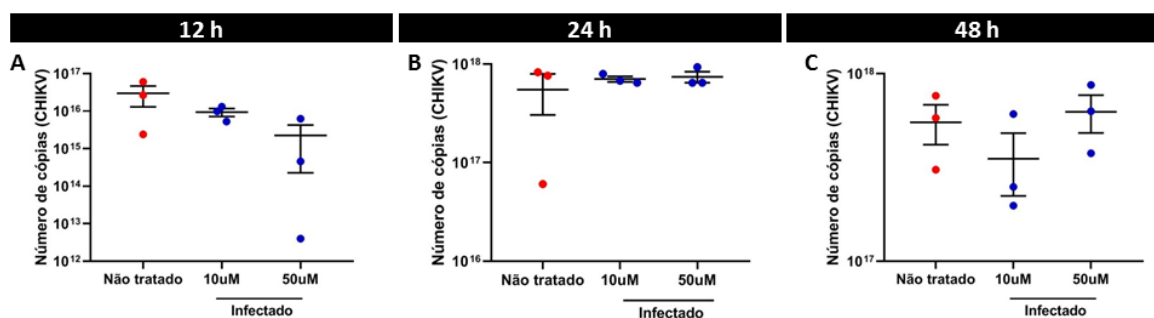


Figura 19. Efeito do tratamento com Ac2-26 diretamente sob a infecção pelo CHIKV em cultura primária de FLS.

Foi utilizado, na oitava passagem celular, cultura de FLS derivada da articulação tibiofemoral de camundongos C57BL/6 com 4 semanas de idade. Foram plaqueadas 1×10^5 células por poço e utilizado MOI de 0,1 de vírus CHIKV por poço infectado, em triplicata, enquanto que poços controle receberam apenas meio DMEM. Após 1 h do momento de infecção, tempo de adsorção viral, o sobrenadante foi removido e então adicionado 300 μL de meio DMEM aos poços controle e infectado não tratado, enquanto que os poços tratados receberam respectivos tratamentos de 10 μM ou 50 μM de Ac2-26 em 300 μL de meio DEMEM. As placas foram mantidas em condição padrão de estufa de cultura umidificada e, após coleta de sobrenadante, os FLS passaram por extração de RNA e técnica de RT-qPCR. O título viral identificado foi expresso em números de cópias amplificadas de CHIKV em escala logarítmica para 12 h (A), 24 h (B) e 48 h (C) pós-infecção. Cada grupo experimental apresentou-se em triplicata e a avaliação estatística feita utilizando ANOVA one way e teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

Ao longo do tempo, o CHIKV exibe uma expansão contínua em sua distribuição geográfica, estabelecendo focos endêmicos ao redor do mundo. Esse fenômeno tem dado origem a surtos de considerável impacto socioeconômico e na qualidade de vida de indivíduos afetados, especialmente devido a sintomas persistentes de natureza artritegênica, característicos da doença. Deste modo, faz-se de grande importância aprofundar a compreensão dos mecanismos subjacentes à infecção, especialmente aqueles que tangem ao ambiente articular, a fim de direcionar de forma mais eficaz as estratégias terapêuticas e, portanto, mitigar as consequências da doença.

Através da criação de um modelo murino de infecção, capaz de reproduzir manifestações sintomatológicas associadas à febre chikungunya, foi desenvolvida uma ferramenta essencial para a investigação dessa doença. Uma das principais vantagens do modelo utilizado nesse estudo, previamente bem padronizado e validado em trabalhos do grupo, reside no emprego de camundongos selvagens, eliminando, assim, vieses associados à necessidade de introduzir modificações genéticas que os tornariam suscetíveis à infecção experimental (Moreira *et al.*, 2022; de Araújo *et al.*, 2022). Ademais, a modulação da infecção pelo CHIKV em modelo murino pela ANXA1, utilizando o peptídeo Ac2-26, foi previamente investigada em nosso grupo, demonstrando a participação da proteína em aspectos resolutivos da doença (de Araújo *et al.*, 2022). Entretanto, efeitos diretamente relacionados à articulação e seus componentes não foram foco de investigação, deixando uma lacuna de estudo fundamental para compreensão completa da influência da patologia sob o principal sítio de sintomas crônicos acometido na febre Chikungunya. Deste modo, a influência da ANXA1 diretamente na articulação durante infecção pelo CHIKV foi demonstrada neste trabalho em análise histopatológica, de modo comparativo entre camundongos selvagens e nocautes para a proteína. Em modelos de artrite experimental não infecciosa, camundongos deficientes em ANXA1 apresentam uma resposta inflamatória mais prolongada e intensificada, bem como maior dano articular (Yang *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2012; Yang, Morand & Leech, 2013; Perretti *et al.*, 2017). Em concordância, a ausência de ANXA1 endógena em nosso modelo de infecção murino pelo CHIKV culminou em

quadro de hiperplasia mais acentuada e persistente da membrana sinovial até o último ponto de tempo avaliado de 7ºd.p.i., o qual é relacionado ao pico de alterações teciduais para tecidos previamente elucidados, como a pata (Figura 12). Além disso, esse resultado indica que a membrana sinovial é uma estrutura ativa durante a infecção pelo CHIKV e a sua caracterização pode trazer novas perspectivas para o direcionamento de estratégias terapêuticas.

Nesse segmento, compondo a membrana sinovial, os FLS são células de participação ativa no processo artritogênico das articulações sinoviais, demonstrando perfil modulador do processo inflamatório e de integridade óssea. Como evidenciado na literatura, o CHIKV tem capacidade de infecção dessas células, as quais se mantêm como reservatórios de proteínas e RNA de origem viral por um longo período de tempo (Young *et al.*, 2019; Hoarau *et al.*, 2010). Além disso, é conhecido que fibroblastos dérmicos contribuem para formação de um ambiente pró-inflamatório em estágios iniciais da infecção pelo CHIKV (Ekchariyawat *et al.*, 2015). Quanto à articulação, demonstramos neste trabalho através de citometria de fluxo, que os FLS são células que contribuem para hiperplasia sinovial associada à infecção pelo CHIKV, aumentada principalmente pela subpopulação CD90-FAP+. Esses fibroblastos demonstram metabolismo ativo, proliferativo e de participação em processos de acometimento de componentes da articulação (Pap *et al.*, 2020; Croft *et al.*, 2019).

RANKL é um ligante relacionado ao dano ósseo e durante infecção pelo CHIKV conseguimos identificar aumento de sua expressão em todas as subpopulações de FLS analisadas, destacando-se como possível mecanismo de dano articular tardio associado ao processo infeccioso. O monitoramento desse perfil celular de FLS intimamente relacionado ao ligante RANKL por um período maior de tempo pós-infecção poderia elucidar melhor sua participação e contribuição à fase crônica de acometimento articular da febre Chikungunya, compondo uma nova perspectiva de interesse. Além disso, é relevante considerar que o acompanhamento da expressão de OPG pode ser uma estratégia adicional para confirmar a influência do ligante RANKL sobre a articulação em um contexto infeccioso, visando identificar um desequilíbrio entre essas duas moléculas diretamente associadas à danos articulares.

No que diz respeito à influência da ANXA1 nos mecanismos desencadeadores da artrite, sua contribuição é amplamente reconhecida, enquanto seu envolvimento em infecções por arbovírus ainda está em estágios iniciais de elucidação. Existem evidências indicativas de que a ANXA1 pode ser negativamente regulada em resposta ao DENV, ZIKV e também ao CHIKV, manifestando-se através da redução da concentração sérica dessa proteína em indivíduos infectados (Costa *et al.*, 2022; Molás *et al.*, 2020; Puttamallesh *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2023). Em nosso trabalho, explorando essa relação sob a ótica de uso da proteína como uma estratégia terapêutica para a infecção do CHIKV, a ANXA1, com ação mimetizada pelo peptídeo Ac2-26, demonstrou controlar em administração sistêmica certo grau de hiperplasia de FLS, sob a subpopulação CD90-FAP+, e ainda reverter o fenótipo de presença do ligante RANKL em todas as subpopulações que trabalhamos (Figura 15), demonstrando uma ação de controle a dano ósseo. Em conjunto ao trabalho de Araújo e colaboradores (de Araújo *et al.*, 2022), o qual demonstrou participação do peptídeo Ac2-26 na redução de parâmetros inflamatórios de pata e de dano, nosso trabalho evidencia o importante papel da ANXA1 no controle da progressão da fisiopatologia da infecção pelo CHIKV. Além disso, em trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa foi identificado, por meio de análise histopatológica, a presença de alterações inflamatórias articulares no modelo de infecção pelo CHIKV, notavelmente atenuadas na ausência do receptor TNF (Moreira *et al.*, 2022). No entanto, vale ressaltar que durante essa avaliação não foi possível identificar perda óssea, o que poderia indicar uma limitação intrínseca do modelo experimental em relação à detecção desse parâmetro. Essa limitação pode ser atribuída à natureza autolimitante da infecção pelo CHIKV no modelo murino, que, em geral, se resolve em um período relativamente curto, dificultando a visualização de manifestações de acometimento ósseo.

Quanto aos parâmetros inflamatórios articulares em modelo *in vivo*, pela dificuldade de detecção de mediadores imunes através de ensaio ELISA no tecido periarticular tibiofemoral, o design de um painel de marcadores imunológicos para citometria de fluxo seria uma alternativa de maior precisão para identificação de um fenótipo associado à infecção e tratamento com Ac2-26. Para tecidos de conhecido impacto intenso da infecção pelo CHIKV, avaliamos neste trabalho níveis da quimiocina CCL2 no coxim plantar de animais que receberam tratamento em

estratégia de administração sistêmica de Ac2-26 frente à infecção pelo CHIKV. Deste modo, obtivemos indícios de que o peptídeo Ac2-26 exerceu influência sob a inflamação plantar, diminuindo o nível da quimiocina em animais tratados, em relação a animais infectados e não tratados (Figura 13B). O aumento das concentrações teciduais de CCL2 em animais infectados pelo CHIKV é conhecido, acompanhado por aumento da vascularização em articulações do tornozelo, por exemplo (Chen *et al.*, 2022; NG, L. F. P., 2017). Como o controle da inflamação tem impacto direto na evolução da doença causada pelo CHIKV, esse mecanismo de contenção de nível da quimiocina exercido pelo Ac2-26 pode atuar no controle de manifestações graves, pela restrição no recrutamento de leucócitos e perpetuação de eventos inflamatórios. Além disso, trabalho recente na literatura demonstra que o tratamento com anti-inflamatório *bindarit*, um inibidor de CCL2, é relacionado a menores graus de gravidade da doença causada pelo CHIKV, acentuando participação da quimiocina no processo fisiopatológico dessa infecção (Chen *et al.*, 2022).

A estratégia de tratamento com Ac2-26 em modelo de administração local também manifestou influência no parâmetro inflamatório, nessa circunstância, com diminuição em nível da citocina IL-6 no coxim plantar de animais infectados e tratados, em relação a animais infectados (Figura 16B). Essa citocina é um dos principais mediadores associados à persistência das artralguas em fase crônica da febre Chikungunya, prolongando a sobrevivência de células inflamatórias, atuando no recrutamento de leucócitos e estímulo de endotélio, por exemplo (Chow *et al.*, 2011; Noret *et al.*, 2012; Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Além disso, é associada a maior expressão de RANKL e inibição de OPG, contribuindo para quadros de acometimento ósseo e dano articular (Phuklia *et al.*, 2013; Noret *et al.*, 2012). Assim, como para a quimiocina CCL2, o controle dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios pelo tratamento com Ac2-26 faz-se de importância pra manutenção da progressão da febre Chikungunya.

A dinâmica de participação direta de FLS durante infecção pelo CHIKV e administração de Ac2-26 em âmbito imune foi melhor explorada neste trabalho a partir do desenvolvimento de cultura primária de FLS derivados de animais de mesma linhagem e idade daqueles utilizados em modelo *in vivo*. A infecção pelo CHIKV já é reportada na literatura como um fator que altera expressão e perfil de

fibroblastos dérmicos humanos em cultura, mas o mesmo ainda não foi explorado para FLS murinos (Parashar *et al.*, 2018). Assim, neste trabalho inovamos em conseguir, a partir da padronização do modelo de infecção *in vitro* pelo CHIKV, observar a expressão aumentada por FLS murinos para citocina IL-6, quando MOIs foram superiores a 0,01, em relação a poços de células não infectadas (Figura 17A-C). No período de 48 h pós-infecção, a concentração da citocina excedeu o limite de detecção do ensaio ELISA para o maior valor de MOI investigado, que foi de 1. Isso sugere uma presença excessiva da citocina, possivelmente correlacionada à viabilidade celular encontrada sob essas condições (Figura 17C, F). A viabilidade celular passa a ser afetada em relação ao controle negativo para ambos os grupos apenas após 24 h pós-infecção *in vitro*, sendo o ponto de 48h de grande contraste. Nesse ponto temporal, poços infectados em MOI de 0,01 mantiveram valores próximos aos encontrados para poços controle, enquanto que os demais MOIs avaliados (0,1 e 1), apresentaram menor viabilidade celular, correlata à alta produção de IL-6 (Figura 17). Assim, foi possível visualizar que a infecção pelo CHIKV em MOI de 0,01 não foi eficaz, uma vez que se mostrou próxima de valores pontuados a poços não infectados, tanto para presença de citocina em sobrenadante, quanto para viabilidade celular. Além disso, como os MOIs de 0,1 e 1 mostraram-se eficazes quanto à infecção frente aos parâmetros analisados, optamos por seguir com a seleção daquele de menor valor, MOI de 0,01, a fim de evitar níveis altos de citotoxicidade.

Ainda neste âmbito do desenho experimental *in vitro*, consideramos a possibilidade de estabelecer uma cultura de FLS primários derivados de animais infectados pelo CHIKV e submetidos à eutanásia no 7º d.p.i.. A intenção era realizar uma análise comparativa entre o perfil desses FLS e aqueles derivados de animais não infectados, por exemplo, no que se refere à produção de citocinas frente à infecção *in vitro* e a novos estímulos inflamatórios. Contudo, apesar das tentativas empreendidas, a cultura de tecido sinovial tibiofemoral derivada de animais que foram previamente infectados não obteve sucesso. Inicialmente, algumas células aderiram à superfície da garrafa de cultura, mas rapidamente se desprenderam, inviabilizando sua manutenção e, conseqüentemente, a realização da experimentação planejada. Uma possível justificativa para a perda de aderência e viabilidade dessas células pode relacionar-se ao fato de que FLS, em circunstâncias

de infecção pelo CHIKV, funcionam como reservatórios de porções virais mesmo após controle de viremia. Este fato, aliado à permanência de perfis de ativação por essas células mesmo na ausência do estímulo infeccioso inicial, criam uma vulnerabilidade celular que pode ter culminado em alterações que inviabilizaram sua adaptação à condição de cultura (Hoarau *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2021; Nygaard *et al.*, 2020).

Após a identificação do MOI ótimo, desenvolvemos uma estratégia de tratamento *in vitro* com Ac2-26, com o foco na avaliação da influência da ANXA1 na modulação do perfil de FLS. Identificamos no período de 12 h e 48 h pós-infecção um efeito positivo do tratamento quanto ao controle dos níveis de IL-6 para ambas as concentrações de Ac2-26 testadas no tempo de 12 h e apenas na concentração de 50 μ M no tempo mais tardio analisado (Figura 18A,B). Esses resultados indicam uma influência direta da ANXA1 sob os FLS, moldando-os a um perfil de menor atividade frente à infecção pelo CHIKV, principalmente em concentrações mais altas do peptídeo.

Ademais, estudos que abordem períodos de tempo prolongados pós-infecção podem ser de grande relevância para a identificação de um perfil celular de FLS que esteja associado aos estados crônicos da febre Chikungunya. Essas células apresentam potencial de associação a essa fase da doença por funcionarem como reservatórios de porções virais por longos períodos após a infecção, além do fato de manterem alterações que apresentam após sua ativação, mesmo na ausência do estímulo inflamatório inicial, como paralelamente são mantidos sintomas crônicos da febre Chikungunya, mesmo na ausência de vírus circulante (Hoarau *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2021; Nygaard *et al.*, 2020).

Quanto à determinação da carga viral na cultura primária de FLS tratada com Ac2-26, os valores que obtivemos para ambos os tempos avaliados foram semelhantes entre os diferentes grupos, tratados ou não, sendo ausentes diferenças estatísticas. Isso demonstra que o tratamento com Ac2-26, peptídeo que possui caráter de controle inflamatório e estímulo pró-resolutivo, não prejudicou a capacidade celular dos FLS em responder à infecção, uma vez que o número de cópias de CHIKV em células tratadas não aumentou em relação ao observado para células infectadas e não tratadas. Além disso, para avaliar uma possível diminuição

quanto ao título de CHIKV a partir do tratamento com Ac2-26, seria de maior impacto um contexto para além da cultura primária de FLS, uma vez que a montagem de resposta imune articulada pelo peptídeo demandaria uma organização de células imunes e de mediadores em âmbito sistêmico. Em trabalho prévio de nosso grupo, o tratamento com quatro doses diárias de Ac2-26 por via i.p. (150 µg / camundongo) em animais de linhagem BALB/c não demonstrou eficácia no controle do título viral na pata (de Araújo *et al.*, 2022). Entretanto, em nossos modelos *in vivo* de tratamento com Ac2-26, descritos neste trabalho, o título tecidual não foi determinado, assim, o uso de técnicas de titulação viral por ensaio de formação de placas de lise pode ser promissor para identificação de um possível fenótipo de controle infeccioso. Além disso, um ponto importante relacionado ao experimento *in vitro* que performamos é o fato do número de cópias de CHIKV obtidas para ambos os grupos e tempos avaliados ser extremamente alto quando considerado inóculo inicial e o tempo de avaliação pós-infecção. Assim, faz-se necessário novas análises para confirmação dos valores obtidos.

Por fim, quanto às avaliações de nocicepção em modelo *in vivo* de infecção pelo CHIKV, em ambas estratégias de administração de Ac2-26 não houve melhora no parâmetro quando no 7^o d.p.i. (Figura 13A, Figura 16A). Em contraste, de modo interessante, na estratégia de tratamento por via de administração local os valores de limiar que obtivemos no 1^o e 3^o d.p.i. para animais infectados e tratados foram significativamente menores do que aqueles identificados em animais infectados e não tratados, indicando melhora na condição. É importante notar que os valores do limiar de retirada de pata em animais infectados e não tratados apresentaram um aumento significativo no 7^o d.p.i., podendo estar associado a uma resolução mais rápida da infecção nesses animais ou a condições do momento de leitura de nocicepção as quais os animais foram submetidos. Essa variação nos valores dificultou a obtenção de uma conclusão definitiva quanto à eficácia do tratamento local para controle nociceptivo. Em perspectiva, o monitoramento até pontos mais tardios pós-infecção para ambas estratégias de tratamento seria uma abordagem interessante na tentativa de identificar um controle do sintoma crônico da dor em pontos mais recentes do que o ocorrido espontaneamente para o modelo. Além disso, os mecanismos associados ao desenvolvimento da dor causada pelo CHIKV

são pouco discutidos e elucidados, sendo, portanto, essencial sua investigação para melhor compreensão da doença.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, esse trabalho destaca a presença de hiperplasia sinovial por aumento da população de FLS em animais infectados pelo CHIKV, células que demonstraram um perfil ativo e de influência sob o acometimento ósseo, como através da expressão de RANKL, a qual foi aumentada em todas as subpopulações de FLS avaliadas. Nesse contexto, o tratamento em via de administração sistêmica de Ac2-26 foi capaz de reverter essas condições, montando um ambiente resolutivo. Além disso, os níveis de CCL2 e IL-6, mediadores pró-inflamatórios aumentados na pata durante infecção pelo CHIKV, foram controlados respectivamente pela administração em via sistêmica e local de Ac2-26. Em modelo *in vitro*, essa influência sob aspecto imune foi novamente alcançada, com o controle da liberação de IL-6 por FLS durante infecção pelo CHIKV até 48 h pós-infecção. Já no que tange ao parâmetro nociceptivo, animais tratados por via de administração local com Ac2-26 demonstraram relativa melhora quando em estágios iniciais da infecção pelo CHIKV até o 7^o d.p.i., quando o tratamento deixou de exercer influência.

Portanto, de modo geral, é relevante a participação de FLS durante infecção pelo CHIKV no ambiente articular tibiofemoral, pela expressão de mediadores imunes e RANKL, fenótipo o qual pode ser redirecionado pelo caráter pró-resolutivo da ANXA1 nesse contexto tecidual infeccioso, de modo à melhora dos sintomas causados pela infecção do CHIKV.

7. REFERÊNCIAS

- ALIOTA, M. T., et al. "The WMe1 Strain of Wolbachia Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes Aegypti*." **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004677, 2016.
- AMARAL, J. K., et al. "Pathogenesis of Chronic Chikungunya Arthritis: Resemblances and Links with Rheumatoid Arthritis." **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 52, p. 102534, 2023.
- ANTUNES DB, C. A., et al. "Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline." **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 49, p. 668–679, 2016.
- AZAR, S. R., et al. "Epidemic alphaviruses: ecology, emergence and outbreaks." **Microorganisms**, v. 8, p. 1167, 2020.
- BAER, A., KEHN-HALL, K. "Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems." **National Center for Biodefense and Infectious**, v. 93, p.1-10, 2014.
- BARRERA, R. "New tools for *Aedes* control: mass trapping." **Curr. Opin. Insect Sci**, v. 52, p. 100942, 2022.
- BASORE, K., et al. "Cryo-EM structure of Chikungunya virus in complex with the Mxra8 receptor." **Cell**, v. 177, p. 1725–1737, 2019.
- BARTHOLOMEEUSEN K., et al. "Chikungunya Fever." **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, 2023.
- BAUER, STEFAN, et al. "Fibroblast Activation Protein Is Expressed by Rheumatoid Myofibroblast-like Synoviocytes." **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 6, p. R171, 2006.
- BELVEDERE R., BIZZARRO V., POPOLO A., et al. "Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells." **BMC Canc**, v. 14, n. 1, p. 961, 2014.
- BIOSynthesis, 2021. "**How Are Viral RNA Copy Numbers Calculated.**" Disponível online em; www.biosyn.com/faq/How-are-viral-RNA-copy-numbers-calculated.aspx.
- BURT, FELICITY J., et al. "Chikungunya Virus: An Update on the Biology and Pathogenesis of This Emerging Pathogen." **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 107–117, 2017.
- CHELLINI F., et al. "Platelet-rich plasma prevents in vitro transforming growth factor-beta1-induced fibroblast to myofibroblast transition: involvement of vascular

endothelial growth factor (VEGF)-A/VEGF receptor-1-mediated signaling (dagger).” **Cells**, v. 7, n. 9, p. 142, 2018.

CHEN, W., et al. “Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya Virus Infection.” **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 581–593, 2015.

CHOW, A., et al. “Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor.” **J. Infect. Dis.**, v. 203, p. 149–157, 2011.

COSTA, V. V., et al. “Targeting the Annexin A1-FPR2/ALX Pathway for Host-Directed Therapy in Dengue Disease.” **ELife**, v. 11, p. e73853, 2022.

COSTA, V. V., et al. “Lithothamnion muelleri Treatment Ameliorates Inflammatory and Hypernociceptive Responses in Antigen-Induced Arthritis in Mice.” **Plos One**, v. 10, 2015.

CONTOPOULOS-LOANNIDIS, D., et al. “Mother-To-Child Transmission of Chikungunya Virus: A Systematic Review and Meta-Analysis.” **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006510, 2018.

CROFT, ADAM P., et al. “Distinct Fibroblast Subsets Drive Inflammation and Damage in Arthritis.” **Nature**, v. 570, n. 7760, p. 246–251, 2019.

CUNHA, T. M., et al. “A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice.” **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n.5, p.1755-1760, 2005.

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

D’ACQUISTO F., et al. “Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells.” **Eur. J. Immunol.** v. 37, p. 3131-3142, 2007.

de ARAÚJO, S., et al. “Annexin A1-FPR2/ALX Signaling Axis Regulates Acute Inflammation during Chikungunya Virus Infection.” **Cells**, v. 11, p. 2717, 2022.

de LIMA, C., et al. “A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development.” **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 969, 2022.

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 Negl. Trop. Dis.**, v. 15, p. e0009290, 2021.

DIARRA D., et al. “Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling.” **Nat. Med.**, v. 13, p. 156-163, 2007.

DONNELLY SR, MOSS SE. "Functional analysis of the human annexin I and VI gene promoters." **Biochem J.**, v. 332, p. 681-687, 1998.

EKCHARIYAWAT, P., et al. "Inflammasome Signaling Pathways Exert Antiviral Effect against Chikungunya Virus in Human Dermal Fibroblasts." **Infection, Genetics and Evolution**, v. 32, p. 401–408, 2015.

FERLAZZO V., et al. "Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis." **Int Immunopharm.**, v. 3, p. 1363-1369, 2003.

FILER, A. "The Fibroblast as a Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis." **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 413–419, 2013.

FLOWER, R.J., BLACKWELL, G.J. "Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation." **Nature**, v. 278, p. 456-459, 1979.

FULLERTON, J N., & DEREK W. G. "Resolution of Inflammation: A New Therapeutic Frontier." **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551–567, 2016.

GALVÃO, I. et al. "The Role of Annexin A1 in the Modulation of the NLRP3 Inflammasome." **Immunology**, v. 160, n. 1, p. 78–89, 2020.

GALVÃO I., et al. "Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout." **Eur J Immunol.** v. 47, n.3, p.585-596, 2017.

GOO, L. et al. "A virus-like particle vaccine elicits broad neutralizing antibody responses in humans to all Chikungunya virus genotypes." **J. Infect. Dis.**, v. 214, p. 1487–1491, 2016).

GUO D., et al. "Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis." **Joint Bone Spine**, v. 75, n. 4, p. 439–444, 2008.

HAN, PF., et al. "Annexin A1 Involved in the Regulation of Inflammation and Cell Signaling Pathways." **Chinese Journal of Traumatology**, v. 23, n. 2, p. 96–101, 2020.

HARIDAS V., et al. "Reciprocal regulation of proinflammatory Annexin A2 and anti-inflammatory ANXA1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." **Mol Biol Rep.**, v. 46, p. 83-95, 2019.

HAYHOE, R.P., et al "Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement." **Blood**, v. 107, p. 2123-30, 2006.

HOARAU, J. J., et al. "Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response." **J. Immunol.**, v. 184, p. 5914–5927, 2010.

JEREMIASSE, B., et al. "Alterations in the Chondrocyte Surfaceome in Response to Pro-Inflammatory Cytokines." **BMC Molecular and Cell Biology**, v. 21, n. 1, 2020.

KELLY, L., et al. "Annexin-A1: The Culprit or the Solution?" **Immunology**, v. 166, n. 1, p. 2–16, 2022.

KIM, A. S; MICHAEL S. D. "A Molecular Understanding of Alphavirus Entry and Antibody Protection." **Nature Reviews Microbiology**, p. 1–12, 2022.

KISSELBACH L.; MERGES M.; BOSSIE A.; BOYD A. "CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures." **Cytotechnology**, v. 59, p. 31-44, 2009.

KOLIMENAKIS, A. et al. "The role of urbanisation in the spread of Aedes mosquitoes and the diseases they transmit — a systematic review." **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 15, p. e0009631, 2021.

KOMATSU, N.; HIROSHI T. "Mechanisms of Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis - Immune Cell–Fibroblast–Bone Interactions." **Nature Reviews Rheumatology**, v. 18, n. 7, p. 415–429, 2022.

KONTTINEN, Y. T., et al. "Synovial Fibroblasts." **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 17, n. sup76, p. 95–103, 1988.

LABADIE, K. et al. "Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral in macrophages." **J. Clin. Invest.**, v. 120, p. 894–906, 2010.

LEE W. W. L., et al. "Expanding Regulatory T Cells Alleviates Chikungunya Virus-Induced Pathology in Mice." **J Virol.**, v.89, n.15, p.7893– 7904, 2015.

LIU A., et al. "Expression of the ANXA1 gene is associated with suppression of growth, invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma." **Mol Med Rep.**, v. 10, p. 3059-3067, 2014.

LUM, F.M., NG., L.F. "Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis." **Antivir. Res.**, v.120, p.165-174, 2015.

MATUSALI, G., et al. "Tropism of the Chikungunya virus." **Viruses**, v. 11, n. 175, 2019.

MARIMOUTOU, C., et al. "Chikungunya Infection: Self-Reported Rheumatic Morbidity and Impaired Quality of Life Persist 6 Years Later." **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 7, p. 688–693, 2015.

MEI YF., et al. “Expression of annexin A1 in peripheral blood cells of Naive rheumatoid arthritis patients and its influencing factors.” **Zhonghua Yixue Zazhi.**, v. 97, p. 1937-1941, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Casos de Chikungunya Aumentaram Neste Início de Ano; Confirma Medidas Para Prevenir.” **Ministério Da Saúde**, 2023. www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/marco/casos-de-chikungunya-aumentaram-neste-inicio-de-ano-confirma-medidas-para-prevenir.

MIZOGUCHI, F., et al. “Functionally Distinct Disease-Associated Fibroblast Subsets in Rheumatoid Arthritis.” **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

MOLÁS, R.B.; et al. “The involvement of annexin A1 in human placental response to maternal Zika virus infection.” **Antiviral Res.**, v.179, p.104809, 2020.

MORAND, E. F., et al. “Regulation of Annexin I in Rheumatoid Synovial Cells by Glucocorticoids and Interleukin-1.” **Mediators of Inflamm.**, v. 2006, p. 1–6, 2006.

MOREIRA, J., et al. “Mapping the global landscape of chikungunya rapid diagnostic tests: a scoping review.” **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 16, p. e0010067, 2022.

MOREIRA, P. S., et al. “Tumour necrosis factor plays a deleterious role in the pathogenesis of chikungunya virus infection.” **Immunology**, 2022.

MOSS, SE.; MORGAN RO. “The annexins.” **Genome Biol.**, v. 5, n. 219, 2004.

NATRAJAN, M. S., et al. “Beyond fever and pain: diagnostic methods for chikungunya virus.” **J. Clin. Microbiol.**, v. 57, p. e00350-19, 2019.

NG, L. F. P. “Immunopathology of Chikungunya virus infection: lessons learned from patients and animal models.” **Annu. Rev. Virol.**, v. 4, p. 413–427, 2017.

NG LF, et al. “IL-1 β , IL-6, and RANTES as biomarkers of chikungunya severity.” **PLOS ONE**, v. 4, p. e4261, 2009.

NORET, M., et al. “Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by Chikungunya virus-infected human osteoblasts.” **J. Infect. Dis.**, v. 206, p. 455–457, 2012.

NYGAARD, G.; GARY S. F. “Restoring Synovial Homeostasis in Rheumatoid Arthritis by Targeting Fibroblast-like Synoviocytes.” **Nature Reviews Rheumatology**, 2020.

PAP, T., et al. “Synovial Fibroblasts and Articular Tissue Remodelling: Role and Mechanisms.” **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 101, p. 140–145, 2020.

PARASHAR, D., et al. “Altered MicroRNA Expression Signature in Chikungunya-Infected Mammalian Fibroblast Cells.” **Virus Genes**, v. 54, n. 4, p. 502–513, 2018.

PARENTE, L.; SOLITO, E. "Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein." **Inflamm Res.**, v. 53, p. 125-132, 2004.

PATEL, H. B, et al. "The Impact of Endogenous Annexin A1 on Glucocorticoid Control of Inflammatory Arthritis." **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, n. 11, p. 1872–1880, 2012.

PERRETTI, M.; JESMOND D. "Resolution Pharmacology: Focus on Pro-Resolving Annexin A1 and Lipid Mediators for Therapeutic Innovation in Inflammation." **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 63, n. 1, 2022.

PERRETTI, M., et al. "Immune Resolution Mechanisms in Inflammatory Arthritis." **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 87–99, 2017.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. "Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation." **Nat Rev Immunol**, v. 9, p. 62-70, 2009.

POON, I. K. H., et al. "Apoptotic Cell Clearance: Basic Biology and Therapeutic Potential." **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 166–180, 2014.

POWERS, A.M., et al. "Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses." **J. Virol.**, v. 75, p. 10118–10131, 2001.

PHUKLIA, W., et al. "Osteoclastogenesis Induced by CHIKV-Infected Fibroblast-like Synoviocytes: A Possible Interplay between Synoviocytes and Monocytes/Macrophages in CHIKV-Induced Arthralgia/Arthritis." **Virus Research**, v. 177, n. 2, p. 179–188, 2013.

PUTTAMALLESH, V.N., et al. "Proteomic profiling of serum samples from chikungunya infected patients provides insights into host response." **Clin. Proteomics.**, v.10, p.14, 2013.

RAMAMOORTHY, S.; JOHN A. C. "Corticosteroids." **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 42, n. 1, p. 15–31, 2016.

RESENDE, F., et al. "The Multifaceted Role of Annexin A1 in Viral Infections." **Cells**, v. 12, n. 8, p. 1131, 2023.

ROQUES, P. et al. "Effectiveness of CHIKV vaccine VLA1553 demonstrated by passive transfer of human sera." **JCI Insight**, v. 7, p. e160173, 2022.

ROSS, R.W. "The Newala epidemic: III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic." **J. Hyg.**, v. 54, p. 177–191, 1956.

SACHS, D. et al. "Cooperative Role of Tumour Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β and Neutrophils in a Novel Behavioural Model That Concomitantly Demonstrates Articular Inflammation and Hypernociception in Mice." **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 72–83, 2011.

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

SIMON, F., et al. “French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations).” **Méd. Mal. Infect.**, v. 45, p. 243–263, 2015.

SOLITO E., et al. “Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin.” **J Immunol.**, v. 165, n. 3, p. 1573-1581, 2000.

SONG H., et al. “Molecular basis of arthritogenic alphavirus receptor MXRA8 binding to Chikungunya virus envelope protein.” **Cell**, v.177, p.1714–1724.e12, 2019.

SOUSA, L. P., et al. “Pharmacological Strategies to Resolve Acute Inflammation.” **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 625–631, 2013.

SRIVASTAVA, P., et al. “Disease Resolution in Chikungunya—What Decides the Outcome?” **Front. Immunol.**, v. 11, p. 695, 2020.

STELITANO, D., et al. “Chikungunya virus: Update on molecular biology, epidemiology and current strategies.” **Transl. Med. Rep.**, v. 3, n. 1, 2019.

STOERMER KA., et al. “Genetic ablation of arginase 1 in macrophages and neutrophils enhances clearance of an arthritogenic alphavirus.” **J. Immunol.**, v. 189, p. 4047–4059, 2012.

SUGIMOTO, M. A., et al. “Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance.” **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

TEO, T., et al. “Fingolimod treatment abrogates chikungunya virus-induced arthralgia.” **Sci Transl Med.**, v. 9, p. 333, 2017.

TEO, T., et al. “A pathogenic role for CD4+ T cells during chikungunya virus infection in mice.” **J Immunol.**, v.190, p.259–269. 2013.

THÉRÈSE C.; MARC L. “Chikungunya Virus Pathogenesis: From Bedside to Bench.” **Antiviral Research**, v. 121, p. 120–131, 2015.

VAGO, J. P., et al. “Annexin A1 Modulates Natural and Glucocorticoid-Induced Resolution of Inflammation by Enhancing Neutrophil Apoptosis.” **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 2, p. 249–258, 2012.

VOSS, J. E., et al. “Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography.” **Nature**, v. 468, p. 709–712, 2010.

WANG, G. H., et al. “Combating mosquito-borne diseases using genetic control technologies.” **Nat. Commun.**, v. 12, p. 4388, 2021.

WANG, Z-M., et al. “Kirenol Upregulates Nuclear Annexin-1 Which Interacts with NF- κ B to Attenuate Synovial Inflammation of Collagen-Induced Arthritis in Rats.” **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 774–778, 2011.

WAUQUIER N., et al. “The acute phase of chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation.” **J. Infect. Dis.** v. 204, p. 115–23, 2011.

WEAVER S. C.; MARC L. “Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease.” **N. Engl. J. Med.**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

WEBB, E., et al. “An evaluation of global Chikungunya clinical management guidelines: a systematic review.” **Clinical Medicine**, v. 54, p. 101672, 2022.

WHO. World Health and Organization, 2018. **Research and Development Blueprint**. Disponível online em; <<https://www.who.int/docs/default-source/blueprint/2018-annual-review-of-diseases-prioritized-under-the-research-and-development-blueprint.pdf>>, acesso em 15 de agosto de 2023.

WHO. World Health and Organization, 2022. **Chikungunya**. Disponível online em; <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>, acesso em 15 de agosto de 2023.

WHO. World Health and Organization, 2016. **Chikungunya fact sheet**. Disponível online em; <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>>, acesso em 17 de agosto de 2023.

WHO. World Health Organization, 2023. “**Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic**.” Disponível online em; <<http://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>.

WRESSNIGG, N., et al. “Single-shot live-attenuated chikungunya vaccine in healthy adults: a phase 1, randomised controlled trial.” **Lancet Infect. Dis.**, v. 20, p. 1193–1203, 2020.

WU, Z., et al. “Fibroblast-like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis: Surface Markers and Phenotypes.” **International Immunopharmacology**, v. 93, p. 107392, 2021.

YANG Y.H.; MORAND E.; LEECH M. “Annexin A1: Potential for glucocorticoid sparing in RA.” **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 9, p. 595–603, 2013.

YANG, Y. H., et al. “Modulation of inflammation and response to dexamethasone by annexin 1 in antigeninduced arthritis.” **Arthritis Rheum.** v. 50, p. 976–984, 2004.

YAW B. T., et al. “Molecular architecture of the Chikungunya virus replication complex.” **Sci. Adv.**, v. 8, p. eadd2536, 2022.

YOUNG, A. R., et al. "Dermal and muscle fibroblasts and skeletal myofibers survive chikungunya virus infection and harbor persistent RNA." **PLoS Pathog.**, v. 15, p. e1007993, 2019.

YOUNG, P. R. "Arboviruses: A Family on the Move." **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1, p. 1–10, 2018.

ZHANG, R., et al. "Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses." **Nature**, v. 557, p. 570–574, 2018.