



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR / PMBqBM

JÚLIA DE ANDRADE BRANDÃO

**Avaliação *in vitro* de alterações biomecânicas, bioquímicas e
moleculares de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos humanos
(HFLS) infectados pelo vírus Chikungunya**

Maceió/AL
2022

JÚLIA DE ANDADE BRANDÃO

Avaliação *in vitro* de alterações biomecânicas, bioquímicas e moleculares de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos humanos (HFLS) infectados pelo vírus Chikungunya

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ênio José Bassi

Maceió/AL
2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

B821a Brandão, Júlia de Andrade.

Avaliação *in vitro* de alterações biomecânicas, bioquímicas e moleculares de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos humanos (HFLS) infectados pelo vírus Chikungunya / Júlia de Andrade Brandão. – 2022.

86 f. : il.

Orientador: Ênio José Bassi.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 70-81.

Anexos: f. 82-86.

1. Vírus chikungunya. 2. Sinoviócitos Semelhantes a Fibroblastos Humanos. 3. Microscopia de força atômica. 4. Análise espectral Raman. 5. Biomecânica. I. Título.

CDU: 543.424.2

À minha família: Daniela, Luanne, Thales,
Liones, Tiago e Thaís.
Por me encherem de força e amor.

AGRADECIMENTOS

Quem bem me conhece sabe que não sou muito dada a demonstrações de afetos. Tampouco as faço de maneira convencional. Então, tampouco meus agradecimentos seguiriam a linha convencional de agradecimentos em uma dissertação de mestrado. Afinal, por que utilizar este espaço senão para colocar em palavras aquilo que se é sentido?

Minha família é pequena. Mas nela cabe um aconchego sem tamanho. E por isso agradeço a eles por, incondicionalmente, apoiarem a minha jornada, mesmo após tantas negativas de minha parte em participar de momentos prazerosos ao lado deles para continuar a caminhada que me permitiu chegar aqui hoje. Agradeço aos meus avós, Liones e Tiago, por entenderem que, nem sempre a falta de disponibilidade da neta significava falta de amor. Pelo contrário. Se existir a personificação da palavra compreensão, certamente eles dois a representariam com maestria. Agradeço pelos cuidados, pelas palavras de incentivo, pelos telefonemas e mensagens preocupadas. Agradeço por perguntarem, da forma mais linda: “o que você faz na UFAL mesmo?” e, em sequência, me ouvirem palestrar com um nível de atenção comparado ao de uma criança assistindo ao seu desenho favorito. Agradeço, pois esses momentos me fizeram ter a confiança necessária para continuar. Agradeço à minha tia Thaís, que sempre me disse palavras sábias e confia piamente na minha capacidade. Agradeço a ela por me proporcionar momentos de alívio, desabafos, risadas e companheirismo. Não à toa, ela também é minha madrinha, palavra que dá sentido ao cuidado e proteção proporcionados por ela. Agradeço à minha irmã, Luanne. Crescer ao seu lado é um privilégio. Obrigada por trazer o alívio cômico que só você sabe proporcionar. Obrigada por ser minha parceira, por me proteger e conhecer tanto de mim quando nem eu mesma sei. Obrigada por ser um norte em tantos momentos onde eu não sabia por onde seguir. Como já te disse uma vez, você é o meu primeiro amor fraterno. Quanto ao segundo amor (não que a ordem de chegada signifique a grandeza do sentimento), obrigada por despertar em mim o cuidado, a preocupação, a ansia e a responsabilidade de educar alguém. Thales é um menino doce a sua maneira e, desde o momento da sua chegada, me trouxe o sentimento desconhecido de proteger alguém. Obrigada por ser meu parceiro e trazer para o meu dia a dia o que irmãos mais novos fazem de melhor: raiva... seguida de uma boa reconciliação com algumas (muitas) risadas.

Por último, mas nunca menos importante, agradeço à minha mãe, Daniela. Parece clichê, mas minha mãe representa uma força astronômica. Gostaria de ter 1/3 da potência que ela tem para conduzir os percalços da vida. Minha mãe sempre lutou para dar a mim e aos meus irmãos o conforto necessário e permitir que sigamos sempre em frente, em qualquer situação da vida. Minha mãe é, e sempre foi, a maior incentivadora da minha carreira acadêmica. Sempre sorri para as minhas conquistas como se fossem as conquistas dela. E de fato são. Seria muito egocêntrico da minha parte não destinar parte do mérito a ela. Esse é apenas um dos muitos reconhecimentos que ela merece. E como disse anteriormente, a ordem não reflete a grandeza do sentimento. Digo isso pois, enquanto escrevia essas palavras, ela me perguntou de um jeito descontraído “Já fez seus agradecimentos a mim? Quero ser a primeira!”. Entenda mãe: minha gratidão a você não cabe em três linhas. Sequer cabe em um único parágrafo destinado a você. Sequer existe sequência lógica para te agradecer, pois são incontáveis os momentos em que você me estende a mão. Talvez eu precisasse de um capítulo. Você representa todas as vertentes da luta diária que uma mãe solo enfrenta e eu tenho muito orgulho de como você conduz suas batalhas. Isso reflete, e muito, na mulher que me torno hoje e todos os dias. Obrigada

por me incentivar de tantas maneiras. Obrigada por me trazer momentos de descontração com suas perguntas e frases “de mãe”. Obrigada por me proporcionar regalias, por me dar alegrias e por me trazer ao mundo pra fazer parte da sua vida. A gente se escolheu nessa e em outras vidas e continuaremos firmes nessa caminhada. Eu acredito nisso. E sei que você também acredita. Amo-te.

Agora, gostaria também de dedicar este espaço aos meus amigos: Arthur, Brenda, Iara, Íria e Luana. Obrigada por segurarem minha mão ao longo da jornada. Por se fazerem presentes mesmo em meio as minhas ausências e em meio a correria da vida adulta. Obrigada por me proporcionarem momentos de diversão, por me tirarem as risadas mais gostosas e por darem sentido a tantas coisas. Obrigada por crescerem comigo e estarem presentes na minha vida há tantos anos. Tudo se torna mais leve quando sei que posso contar com vocês. Agradeço também aos meus amigos do laboratório LAPEVI e membros do grupo de pesquisa IMUNOREG: Elane, Grazielle, Jamile, João, Káthia e Stephannie. Obrigada por tornarem o ambiente de trabalho tão divertido. Obrigada pela cumplicidade e por partilharem comigo os caminhos de se fazer ciência. É uma honra dividir essa história com vocês. Agradeço também a técnica do LAPEVI, Ana Rachel. Obrigada por se fazer presente durante esses anos, por compartilhar inúmeras manhãs e tardes regadas a café. Obrigada pelos ensinamentos e pelas conversas descontraídas. Você também faz parte dessa jornada.

Quero agradecer, em especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Ênio José Bassi. Obrigada pela paciência em ensinar, pela dedicação a este e a tantos outros trabalhos. Obrigada pelos esforços e pela disponibilidade para que esta pesquisa se mantivesse a todo vapor e pelas inúmeras vezes em que mostrou a mim e aos meus colegas o que de fato um professor faz: guiar sabiamente seus alunos para que eles possam dar passos grandes. Prof. Ênio ensinou que podemos e devemos pensar alto e que as limitações podem ser superadas com maestria. Obrigada por depositar a confiança necessária para que eu pudesse desenvolver esta pesquisa em tempo hábil em meio a uma pandemia. O caminho não foi fácil e fizemos um lindo trabalho ao longo desses anos graças a ele.

Gostaria também de agradecer a Prof^a. Dr^a. Letícia Anderson. Prof^a. Letícia foi quem abriu as portas para que eu entrasse na pesquisa científica e me mostrou o quanto ser mulher nessa área demanda força. Obrigada por todas as horas de dedicação, por todas as vezes que ofereceu palavras de conforto e pela amizade construída. Obrigada pela disponibilidade em ensinar com paciência e calma. Pela presença, mesmo em momentos em que não podia estar fisicamente junto. Obrigada por enxergar em mim o potencial que tantas vezes eu mesma não enxerguei e por continuar me proporcionando diversos momentos para que enveredasse pelo meio acadêmico. Se hoje concluo um mestrado, foi porque um dia ela me mostrou que eu poderia fazer muito, mesmo quando temos apenas uma pequena parcela para começar. Você foi e ainda é essencial.

Quero agradecer também aos colaboradores deste trabalho: a Prof^a. Dr^a. Elaine Cristina, por me ajudar a desenvolver os experimentos de Microscopia de Força Atômica e espectroscopia Raman e me ensinar um pouco mais sobre as técnicas. Agradeço aos professores Dr. Eduardo Jorge e Dr. Samuel Teixeira, responsáveis pelo LCMMat, por permitirem o manejo dos equipamentos e contribuírem para a obtenção dos resultados. Agradeço também ao Prof. Dr. Axel Cofré, por contribuir com os experimentos de fluorescência, pelos ensinamentos passados e por toda gentileza e disponibilidade em ajudar. Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Duzzioni por permitir que utilizasse os espaços e equipamentos do seu laboratório, LAIF. Também agradeço ao Prof. Dr. Daniel Gitaí por sempre me receber no LBCM e permitir também a utilização de seus equipamentos.

Por fim, gostaria de agradecer às agências de fomento: a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), que permitiram o desenvolvimento deste trabalho e me ajudaram a continuar trilhando este caminho. Agradeço também ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBm) e aos professores que o compõe e que contribuíram para o meu aprendizado.

A todos, minha imensa gratidão.

Com carinho,

Júlia.

Resumo

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus transmitido por mosquitos do gênero *Aedes sp.*, capaz de causar a febre Chikungunya (CHIKF) em sua fase aguda e evoluir para uma Síndrome Reumática Crônica (SRC). Nesta infecção, tem-se o acometimento das articulações sinoviais que apresentam em sua composição os sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS). Os FLS, em patologias semelhantes à SRC como a artrite reumatóide (AR), apresentam um perfil agressivo capaz de causar danos teciduais severos no processo inflamatório, processo este que pode ocorrer devido a alterações em propriedades biomecânicas celulares. Diante disso, o presente trabalho objetivou identificar alterações biomecânicas, bioquímicas e moleculares em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos humanos (HFLS) após a infecção pelo CHIKV *in vitro*. Para isso, foi realizada a determinação da MOI por MTT e a confirmação da infecção viral por citometria de fluxo intracelular, RT-PCR e infecção de células Vero E6 com sobrenadante de cultivo de HFLS. Foram avaliadas: alterações morfológicas e o módulo elástico de Young através de microscopia de força atômica (MFA); alterações no citoesqueleto por ensaio de fluorescência com marcação para F-actina; alterações bioquímicas através de espectroscopia Raman; alterações na expressão gênica por RT-qPCR; e quantificação quimiocinas no sobrenadante de cultivo através da metodologia de CBA. Os resultados indicaram que os HFLS foram infectados *in vitro*, observando-se uma porcentagem de 46,8% de células positivas para o CHIKV após 48h através de citometria de fluxo intracelular, além da identificação do genoma viral no sobrenadante por RT-PCR. A presença de unidades formadoras de placas (PFUs) na monocamada de células Vero E6 infectadas indicou a presença de partículas virais viáveis no sobrenadante dos HFLS. A análise por MFA evidenciou alterações significativas na morfologia celular e as análises de nanoindentação detectaram um aumento de 107,46% no módulo elástico de Young, sugerindo que a infecção pelo CHIKV pode levar a alterações no citoesqueleto. Análise do citoesqueleto por fluorescência indicaram rompimento dos filamentos de F-actina após 12h de infecção. A espectroscopia Raman e a subsequente análise de PCA indicaram uma variância total de 65% entre os HFLS não infectados e os HFLS infectados pelo CHIKV. Além disso, os principais picos alterados estão relacionados a alterações em amidas primárias e terciárias, folhas β , lipídeos e colágeno, sendo eles os picos 795, 977, 1031, 1223, 1290, 1444, 1495, 1635, 1660 e 1709 cm^{-1} . A análise de expressão gênica indicou um aumento na expressão dos genes *MMP1*, *VEGFA* e *UGDH*. Além disso, um aumento significativo de IP-10 e uma diminuição de MCP-1 foram observadas no sobrenadante 48h após a infecção viral. Em resumo, os resultados apresentados no presente trabalho auxiliam na elucidação das alterações celulares e moleculares envolvidas na interação CHIKV-HFLS, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta arbovirose.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya; HFLS; MFA; Espectroscopia Raman; Alterações biomecânicas

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus transmitted by *Aedes sp.* mosquitoes that causes Chikungunya fever (CHIKF) and could progress to Rheumatic Chronic Syndrome (RSC). The synovial joints are affected during this infection, and fibroblast-like synoviocytes (FLS) are the major cell type in the composition of synovial tissue. FLS in pathologies such as rheumatoid arthritis (RA), assumes an aggressive profile, causing severe tissue damage in the inflammatory process. This damage can occur due to changes in cellular biomechanical properties. Thus, the aim of this work was to understand biomechanical, biochemical and molecular changes in human fibroblast-like synoviocytes (HFLS) after CHIKV infection *in vitro*. Determination of the MOI was performed by MTT assay and viral infection was confirmed by flow cytometry, RT-PCR and infection of Vero E6 cells with HFLS supernatant. The following were evaluated: morphological changes and Young's modulus by atomic force microscopy (AFM); cytoskeleton changes by fluorescence analysis of F-actin labeling; biochemical changes were determined by Raman spectroscopy; relative gene expression analysis by RT-qPCR. Also, the quantification of chemokines was measured in the supernatant using the CBA methodology. As result, HFLS were infected *in vitro* since 46.8% of the cells were CHIKV-positive after 48h of infection in the intracellular flow cytometry analysis. In addition, viral RNA in the cell supernatant was detected by RT-PCR. The detection of plaque-forming units (PFUs) in the monolayer of infected Vero E6 cells indicated the presence of viable viral particles in the HFLS supernatant. AFM analysis shows significant changes in cell morphology and nanoindentation analysis detected a 107.46% increase in Young's elastic modulus, suggesting alterations in the cytoskeleton. Fluorescence cytoskeleton staining indicated disruption of F-actin filaments after 12h of infection. Raman spectroscopy and PCA analysis show a total variance of 65% between uninfected and CHIKV-infected HFLS. In addition, the major alterations detected were related to amide I, amide III, β -sheets, lipids and collagen, with signatures in 795, 977, 1031, 1223, 1290, 1444, 1495, 1635, 1660 and 1709 cm^{-1} . Relative gene expression shows an increase in the expression of *MMP1*, *VEGFA* and *UGDH*. Also, an increase in the IP-10 and a reduction in MCP-1 chemokine levels were detected in the supernatant 48 after viral infection. In summary, the results presented in this work help elucidate the cellular and molecular changes involved in the CHIKV-HFLS interaction, thus contributing to developing new therapeutic strategies for this arbovirus.

Keywords: Chikungunya virus; HFLS; AFM; Raman spectroscopy; Biomechanical alterations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição do genoma e estrutura do vírus Chikungunya (CHIKV).	16
Figura 2. Entrada e replicação celular do vírus Chikungunya (CHIKV).	18
Figura 3. Infecção por <i>Aedes sp.</i> e principais células, tecidos e órgãos acometidos pelo CHIKV. 20	
Figura 4. Elementos do citoesqueleto.....	25
Figura 5. Diagrama esquemático de análise por MFA.	29
Figura 6. Medida do módulo elástico de Young.	30
Figura 7. Sistema de microscópio e espectrômetro Raman.....	32
Figura 8. Espectros Raman típicos de material biológico na região de impressão digital.	33
Figura 9. HFLS infectados por 48h com CHIKV em diferentes MOIs.....	45
Figura 10. Análise da infecção em HFLS pelo CHIKV através de microscopia óptica e citometria de fluxo intracelular.....	46
Figura 11. Confirmação da infecção pelo CHIKV em HFLS através de RT-PCR.	47
Figura 12. Determinação do título viral no sobrenadante de HFLS pelo ensaio de PFU em células Vero E6.....	48
Figura 13. MFA de HFLS não infectados e infectados pelo CHIKV.....	49
Figura 14. Espectrometria Raman de HFLS não infectados e infectados pelo CHIKV. 50	
Figura 15. Diferença espectral entre controle celular e HFLS infectados pelo CHIKV. 52	
Figura 16. Fluorescência de citoesqueleto (F-actina) de HFLS infectados pelo CHIKV.	54
Figura 17. Expressão relativa de genes em HFLS infectados pelo CHIKV.....	55
Figura 18. Modulação de quimiocinas em HFLS após infecção pelo CHIKV.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados para transcrição de cDNA e amplificação da RT-PCR. .	38
Tabela 2 – Sequência de primers para expressão gênica relativa através de RT-qPCR.	42
Tabela 3 – Atribuições espectrais de Raman.....	51
Tabela 4 – Diferenças espectrais Raman entre CC e CHIKV	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AR: Artrite Reumatóide

CBNs: Nanotubos de carbono

cDNA: DNA complementar

CHIKF: Febre Chikungunya

CHIKV: Vírus Chikungunya

CIA: do inglês “*Collagen-Induced Arthritis*”

CMC: Carboximetilcelulose

CPV-I e CPV-II: Vacúolos citopáticos I e II

CCL2/MCP-1: do inglês “*Monocyte chemotactic protein-1/Chemokine (C-C motif) ligand 2*”

CCL5/RANTES: do inglês “*Chemokine (C-C motif) ligand 5/Regulated On Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted*”

Ct: do inglês *Cycle threshold*

CXCL8/IL-8: Interleucina-8 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 8*)

CXCL9/MIG: do inglês “*C-X-C Motif Chemokine Ligand 9*”

CXCL10/IP-10: do inglês “*C-X-C Motif Chemokine Ligand 10*”

DC-SIGN: do inglês “*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*”

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECV: Efeito Citopático Viral

EPM: Erro Padrão da Média

ELISA: do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”

FABP4: do inglês “*Fatty Acid Binding Protein-4*”

FLS: do inglês “*Fibroblast Like-Synoviocytes*”

FT-IR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês “*Fourier-transform infrared spectroscopy*”)

GAGs: Glicosaminoglicanos

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês “*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*”)

HFLS: *Human Fibroblast Like-Synoviocytes*

IFN: Interferon

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-6: Interleucina-6

IL-12: Interleucina-12

IL-15: Interleucina-15

lc-FAOD: do inglês “*Long-chain fatty acid oxidation disorders*”

LINC: Ligante de nucleoesqueleto e citoesqueleto

m7G: 7-metilguanosina

MEC: Matriz extracelular

MFA: Microscopia de Força Atômica

MMPs: Metaloproteinases

MMP1: do inglês “*Matrix Metalloproteinase 1*”

MP: Membrana plasmática

MOI: do inglês “*Multiplicity of Infection*”

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

Mxra8: proteína de remodelamento matricial 8

nsPs: Proteínas não estruturais

NPCs: Complexos de poros nucleares

ORF: do inglês “*Open Reading Frame*”

PCA: Análise de Principais Componentes (do inglês “*Principal Component Analysis*”)

PFU: Unidades Formadoras de Placas (do inglês “*Plaque-Forming Unit*”)

PGs: Proteoglicanos

PLRS: do inglês “*Partial Least Square Regression*”

PoliA: Poliadenilação

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões (*Pattern Recognition Receptors*)

PSA: *Penicillin, Streptomycin and Amphotericin B*

PTM - Modificações pós-traducionais

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RE: Retículo endoplasmático

RNAv: RNA viral

RT-PCR: Reação de Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase

SFB: Soro Fetal Bovino

SRC: Síndrome Reumática Crônica

TF: *Transframe Protein*

TIM: Imunoglobulina de células T e mucina

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UGDH: UDP-glicose 6-desidrogenase humana

VCAM-I: Molécula de adesão vascular 1

VEGFA: Fator de crescimento endotelial vascular A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Patogenia da febre Chikungunya (CHIKF): da partícula viral ao curso da doença	15
2.2 HFLS – <i>Human Fibroblast-Like Synoviocytes</i>	20
2.2.1 Características dos HFLS.....	20
2.2.2 Interação entre HFLS e o vírus Chikungunya.....	22
2.3 Propriedades biomecânicas celulares	23
2.4 Aplicação de Microscopia de Força Atômica (MFA) e espectroscopia Raman em estudos biológicos.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. HIPÓTESE	35
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo geral.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6. MATERIAS E MÉTODOS	37
6.1 Cultivo de HFLS e infecção com o CHIKV	37
6.3 Determinação da infecção viral.....	37
6.3.1 Citometria de fluxo	37
6.3.2 RT-PCR.....	38
6.3.3 Determinação do título viral em células Vero E6 pelo ensaio de detecção de unidades formadoras de placas (PFUs)	38
6.4 Microscopia de Força Atômica (MFA).....	39
6.5 Espectroscopia Raman	40
6.6 Marcação de citoesqueleto por fluorescência.....	41
6.7 Desenho de primers específicos para genes alvo	41
6.8 Extração de RNA celular por TRIzol™	42
6.9 Quantificação do RNA por fluorimetria e avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.....	43
6.10 Quantificação de quimiocinas	43
6.11 Análises estatísticas.....	44
7. RESULTADOS.....	45
7.1 Determinação da MOI de infecção	45
7.2 Confirmação da infecção viral por diferentes metodologias.....	46
7.3 Alterações morfológicas, biomecânicas e bioquímicas através de MFA e espectroscopia Raman	48
7.4 Fluorescência do citoesqueleto.....	54
7.5 Avaliação da expressão gênica.....	55
7.6 Quantificação de quimiocinas	55
8. DISCUSSÃO	57

9. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS.....	82

1. INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus do gênero *Alphavirus*, transmitido por fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, destacando-se as espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* (ROSS, 1956). Isolado inicialmente na Tanzânia em 1952, o CHIKV dispersou-se rapidamente para os países vizinhos da África, chegando às Américas em 2013, sendo responsável por surtos em diversos países (LEPARC-GOFFART et al., 2014; LUMSDEN, 1955). No Brasil, em 2016, ocorreu um surto onde foram reportados 277.882 casos prováveis desta arbovirose, e o estado de Alagoas apresentou uma taxa de incidência de 548,6 casos/100.000 habitantes até a semana epidemiológica nº 52 (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017). Em 2022, os números tornaram-se alarmantes novamente, com 169.376 casos prováveis no Brasil, sendo Alagoas responsável por uma taxa de incidência de 287,5/100.000 habitantes até a semana epidemiológica nº 42 (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2022).

Este vírus causa a febre Chikungunya (CHIKF), uma doença autolimitante aguda, caracterizada por febre de início súbito, exantema, cefaleia, mialgia e poliartralgia, que pode progredir para uma síndrome reumática crônica (SRC), persistindo por meses ou anos (SCHILTE et al., 2013; WEAVER; FORRESTER, 2015). Na SRC as articulações sinoviais são acometidas levando a uma poliartralgia severa e debilitante, influenciando diretamente na qualidade de vida e na saúde mental dos pacientes (CAMPOS et al., 2013; SCHILTE et al., 2013). Em geral, o padrão de envolvimento articular nesta arbovirose é semelhante à artrite reumatoide (AR), acometendo principalmente as pequenas articulações (mãos, punhos, pés e tornozelos) (SILVA; DERMODY, 2017). No entanto articulações maiores, como cotovelos e joelhos, também podem ser afetadas (HASSANTOUFIGHI; WARD; HIGGS, 2017). A sinóvia, em condições normais, envolve as articulações e tem como função o suporte estrutural, lubrificação e nutrição da cartilagem, e é composta principalmente por dois tipos celulares: células sinoviais tipo A ou macrófagos sinoviais; e células sinoviais tipo B ou sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS – *fibroblast-like synoviocytes*) (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). Os FLS são responsáveis pela secreção de ácido hialurônico e produção de matriz extracelular (MEC), conferindo suporte à membrana sinovial, além de secretar lubricina, uma glicoproteína mucinosa que mantém a integridade da cartilagem, proporcionando a sua lubrificação. A interação de lubricina e ácido hialurônico reduz as chances de atrito e desgaste na articulação (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; JAY; WALLER, 2014).

Na AR, a estrutura saudável do tecido sinovial é convertida em uma estrutura semelhante ao pânus cartilaginosa, um revestimento sinovial hiperplásico, com elevados números de células sinoviais tipo A e B, além de outros tipos celulares, que invadem e degradam a matriz cartilaginosa (BUSTAMANTE et al., 2017). O tecido sinovial possui duas camadas, sendo elas a camada íntima ou sínovia (*synovial lining*) e a camada subíntima (*synovial sublining*), que na AR sofrem grandes alterações devido à expansão de FLS. Essa expansão pode ocorrer por uma proliferação e apoptose desequilibradas ou pela ativação dessas células por meio de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento produzidos por macrófagos sinoviais, que possuem um fenótipo altamente ativado (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; IZQUIERDO et al., 2011; PALAO et al., 2004). Além disso, macrófagos e linfócitos constituintes do microambiente sinovial promovem a secreção de citocinas e quimiocinas que induzem a ativação de FLS para um perfil pró-inflamatório, o que, consequentemente, suporta o ambiente hiperplásico (NOSS; BRENNER, 2008).

Estudos prévios relatam que as propriedades biomecânicas celulares estão diretamente relacionadas a funções biológicas importantes como a adesão, divisão, motilidade e diferenciação celular (ARNAOUT; GOODMAN; XIONG, 2007; HUANG; KAMM; LEE, 2004; LANGE; FABRY, 2013). As alterações dessas funções podem estar relacionadas à rigidez, rugosidade e morfologia celular, propriedades físicas que podem ser afetadas por diferentes fatores como a exposição ao tratamento com drogas antitumorais (KIM et al., 2012; LEE et al., 2015); exposição à infecções bacterianas (BOTELHO et al., 2019) e infecções virais (PAUL, 2022); e, até mesmo, a doenças autoimunes, como a AR (LEE et al., 2015). Neste contexto, entender essas propriedades nos FLS pode fornecer o conhecimento necessário sobre o fenótipo agressivo assumido por esse tipo celular frente a um microambiente sinovial invasivo (LEE et al., 2015). Diante disso, abordagens e técnicas biofísicas para determinar propriedades biomecânicas celulares se fazem necessárias (MIERKE, 2020).

Dentre as metodologias mais abordadas na área de biofísica, a Microscopia de Força Atômica (MFA) e a espectroscopia Raman são as mais empregadas para avaliar as propriedades mecânicas e moleculares de células e tecidos (DUFRÊNE; PELLING, 2013; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007). A MFA permite o estudo da superfície morfológica da célula e a identificação de propriedades mecânicas e adesivas a fim de se entender a motilidade celular (CROSS et al., 2007; EL-KIRAT-CHATEL; DUFRÊNE,

2012). Além disso, a MFA pode ser aliada a outras metodologias ópticas para, simultaneamente, visualizar informações adicionais sobre diferentes biomoléculas presentes na composição celular (DUFRENE; PELLING, 2013). Dentre as metodologias aliadas, a espectroscopia Raman é uma das técnicas aplicadas com a finalidade de se obter informações bioquímicas celulares, permitindo a quantificação de alterações a nível celular de componentes como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos (CHOI et al., 2014; NOTINGHER et al., 2003; PAPPAS, 2000). Diante disso, a combinação dessas duas técnicas permite a correlação entre informações químicas e físicas, sendo aplicadas nas áreas de biotecnologia e biomedicina em diferentes condições patológicas (CHOI et al., 2014), como nos processos inflamatórios e artríticos (LEE et al., 2015).

Embora a indução do processo inflamatório pelo CHIKV tenha sido estudada nos últimos anos, a resposta e alterações em FLS frente à infecção por este vírus ainda não foi completamente elucidada. Sendo assim, é importante entender como o CHIKV está envolvido em mecanismos de interação vírus-célula hospedeira (PHUKLIA et al., 2013). A nível celular, os FLS presentes no tecido sinovial das articulações desempenham um papel fundamental no processo inflamatório, degradando o colágeno através da produção de MMPs e da ativação de osteoclastos que produzem altos níveis de citocinas artríticas (PHUKLIA et al., 2013). Além disso, os FLS podem migrar entre as articulações, induzindo a artralgia em articulações não afetadas (LEFÈVRE et al., 2009). O apanhado geral dessas informações reforça a necessidade de estudos aprofundados acerca da patogenia e alterações provocadas pelo CHIKV no microambiente sinovial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Patogenia da febre Chikungunya (CHIKF): da partícula viral ao curso da doença

A febre Chikungunya (CHIKF) é uma arbovirose transmitida por mosquitos do gênero *Aedes sp.* Seu nome deriva do dialeto Makonde e significa “aquele que se dobra” devido a postura assumida pelas pessoas acometidas pela doença, caracterizada por uma artralgia severa (ROSS, 1956), que pode levar à invalidez e a um impacto substancial na qualidade de vida econômica e comunitária (COUTURIER et al., 2012; SCHILTE et al., 2013). Essa doença é transmitida pelo CHIKV, inicialmente isolado em 1952 na Tanzânia, pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus* (ROSS, 1956; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

Esse vírus apresenta um genoma de RNA fita simples senso-positivo [(+)ssRNA] de aproximadamente 11,8kb que na sua extremidade 5' possui uma ORF com um capeamento de 7-metil-guanosina (m7G) que, após tradução, é responsável por codificar as quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) (KHAN et al., 2002). Já a extremidade 3' apresenta uma cauda poliadenilada (PolyA), constituída por outra ORF que é transcrita por um RNAv senso negativo [(-)RNAv] em um RNA subgenômico 26S que dará origem a uma poliproteína estrutural composta pela proteína do capsídeo (C), duas glicoproteínas formadoras do envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos (E3 e 6k) (KHAN et al., 2002). Além disso, há a proteína estrutural TF (*Transframe Protein*) que, juntamente com o peptídeo 6K, pode atuar na formação e brotamento do vírus (FIRTH et al., 2008). A estrutura do vírion apresenta em torno de 60 a 70 nm contendo o capsídeo icosaédrico e o envelope viral (**Figura 1**). No envelope viral encontram-se ancoradas as glicoproteínas E1 e E2 responsáveis pela interação e fusão do vírus com a membrana lipídica da célula hospedeira (SOLIGNAT et al., 2009).

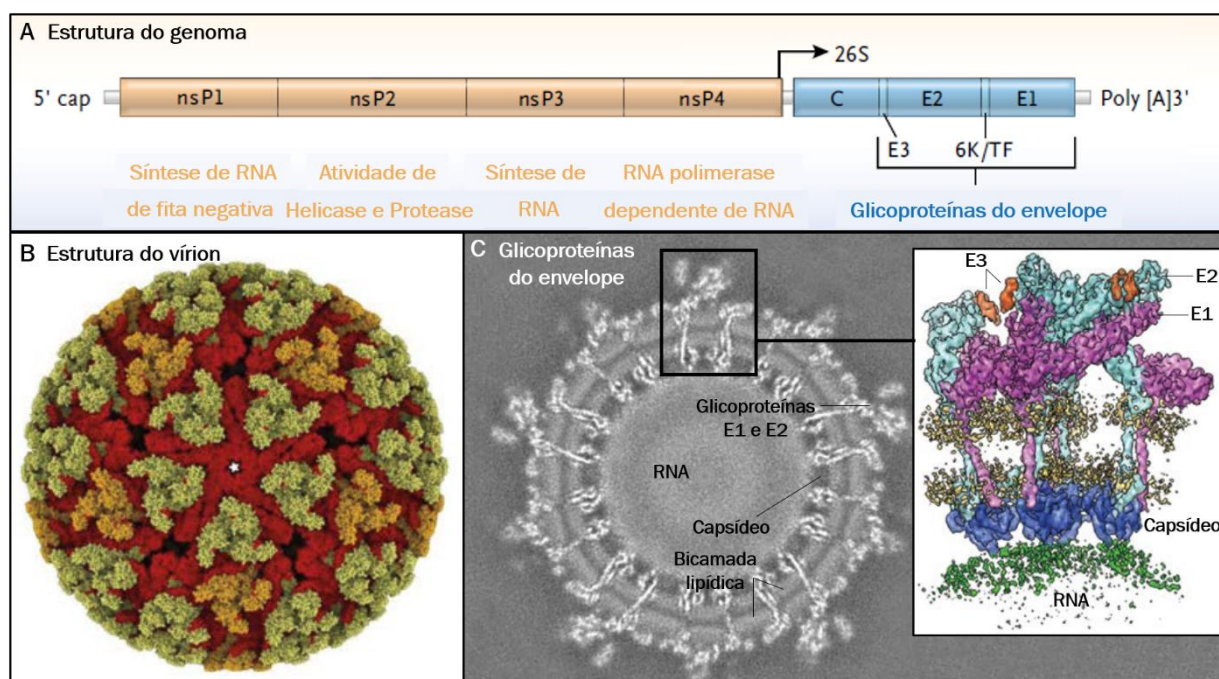


Figura 1. Composição do genoma e estrutura do vírus Chikungunya (CHIKV). (A) Organização do genoma do CHIKV incluindo as proteínas não estruturais (nsP1-4) e suas funções e as proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K/TF e E1); (B) Estrutura do vírion; (C) Microscopia crioeletrônica de transmissão da estrutura do vírion, com destaque para as proteínas do envelope em formato de espículas, responsáveis pela interação e fusão do vírus com a membrana celular. Fonte: Adaptado de Weaver, S. C. e Lecuit, M. (2015).

Após a ligação da glicoproteína E2 ao receptor de membrana Mxra8 (*Matrix Remodeling Associated 8*) nas células-alvo (BASORE et al., 2019; ZHANG et al., 2018), as partículas virais são internalizadas por endocitose mediada por clatrina, onde a

acidificação endossomal desencadeia mudanças nas glicoproteínas virais, levando à fusão da glicoproteína E1 com a membrana endossomal do hospedeiro. Além disso, outras moléculas como os glicosaminoglicanos (GAGs), TIM, DC-SIGN, receptor AXL tirosina quinase e o complexo proteico de membrana CD147 foram descritos participando da interação vírus-hospedeiro como receptores alternativos (ACHARYA et al., 2015; DE CALUWÉ et al., 2021; SILVA et al., 2014). No citoplasma, o nucleocapsídeo é desmontado, liberando o RNA viral genômico (RNA_v) levando à tradução deste na poliproteína precursora não estrutural nsP1234, que é clivada pela protease nsP2 em nsP123 e nsP4. nsP123 e nsP4 formam então a replicase viral de curta duração que irá sintetizar um (-)RNA_v (**Figura 2**). A origem desse (-)RNA_v leva à formação de compartimentos vesiculares pequenos denominados de esférulas, que se formam na membrana plasmática (MP) e servem como local ativo de replicação viral, abrigando e protegendo os intermediários de RNA fita dupla (dsRNA) da degradação e reconhecimento por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*). As esférulas são internalizadas, formando-se assim os vacúolos citopáticos I (CPV-I) (FROLOVA et al., 2010; SILVA et al., 2014; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

Além disso, o acúmulo da poliproteína nsP123 leva ao seu processamento proteolítico, resultando em uma troca da replicase por um isômero conformacional que irá utilizar o (-)RNA_v como modelo para gerar o RNA viral genômico de sentido positivo (+)RNA_v, codificando assim a poliproteína estrutural (C, E3, E2, 6K, TF e E1). Ocorre então a tradução da proteína C e através de autoclivagem esta é liberada da poliproteína estrutural para interagir com os (+)RNA_v recém-sintetizados e formar o nucleocapsídeo icosaédrico contendo uma única molécula de RNA (CONSTANT et al., 2021; STRAUSS; STRAUSS, 1994; THOMAS et al., 2010). Após isso, ocorre a translocação da poliproteína pE2-6K-E1 para o retículo endoplasmático (RE) e para o Complexo de Golgi onde proteases hospedeiras, como a furina, clivam a poliproteína em proteínas individuais E3, E2, 6K/TF e E1. Após a tradução, as proteínas E2 e E1 são transportadas pelo sistema secretor e depositadas na MP. Os nucleocapsídeos são, então, recrutados e unidos com E2 e E1 na MP, resultando no brotamento de partículas virais maduras (SILVA et al., 2014; SNYDER et al., 2013) (**Figura 2**). Um *frameshift* ribossômico na tradução do gene 6K pode acontecer resultando na produção da proteína TF, associadas ao processo de brotamento viral (CONSTANT et al., 2021; SNYDER et al., 2013). No final desse processo, há ainda a formação de vacúolos citopáticos II (CPV-II) contendo

redes hexagonais de E2, E1 e nucleocapsídeos, podendo atuar como veículos de transporte e locais de montagem para proteínas estruturais, permitindo a formação e liberação de vírions maduros (SILVA; DERMODY, 2017; SOONSAWAD et al., 2010).

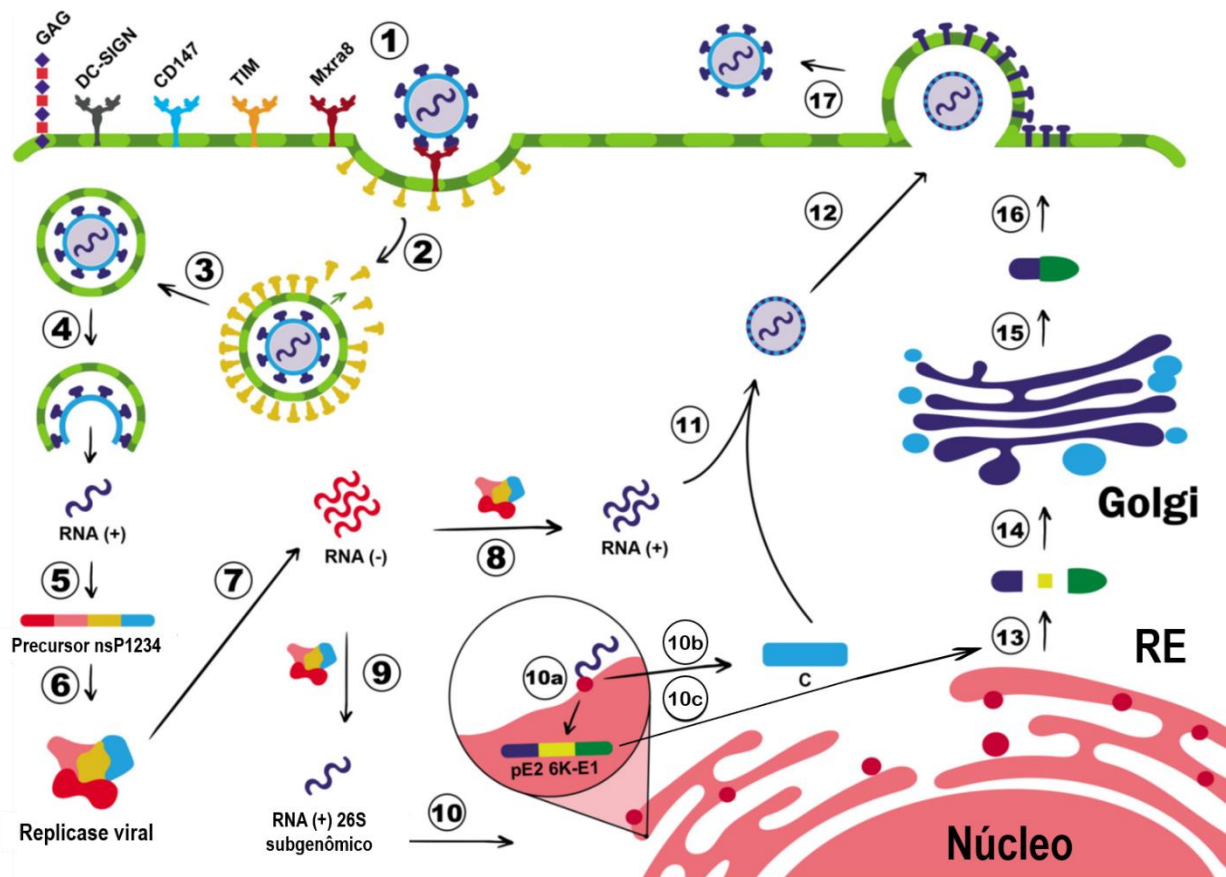


Figura 2. Entrada e replicação celular do vírus Chikungunya (CHIKV). (1) A glicoproteína E2 se liga ao receptor Mxra8. (2) A entrada do CHIKV ocorre via endocitose mediada por clatrina para, posteriormente, (3) ocorrer a dissociação de moléculas de clatrina da vesícula endocítica, (4) permitindo a acidificação do endossomo, o desprendimento de E2-E1 e a fusão de E1 à membrana endossomal. (5) Em seguida ocorre a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma e a tradução da poliproteína nsP1234. (6) A poliproteína é clivada em nsP123 e nsP4 (replicase viral). (7) A replicase viral é responsável pela síntese de (-)RNAv que servirá de (8) molde para o (+)RNAv, (9) assim como para a síntese de RNA subgenômico 26S, (10) que será traduzido na poliproteína C-pE2-6K-E1 no retículo endoplasmático rugoso (RER) (10a). (10b) A proteína C se dissocia da poliproteína e (11) se liga ao (+)RNAv genômico para formar o nucleocapsídeo que (12) se une as proteínas E2 e E1 para formar a partícula viral madura. Em paralelo, (10c) pE2-6K-E1 é redirecionada ao lúmen do RE onde ocorre (13) o processo de maturação, (14) seguindo para via exocítica, (15) formando heterodímeros E2-E1 maduros. (16) Os heterodímeros serão depositados na MP para (17) o brotamento da partícula viral madura para o meio extracelular. Fonte: Adaptado de Constant et al. (2021).

O período de incubação em humanos pode variar de 1 a 12 dias a partir da picada de mosquitos fêmeas hematófagas do gênero *Aedes sp.* que, através do repasto sanguíneo, introduzem partículas virais maduras no hospedeiro (**Figura 3A**) que se replicam no sítio de inoculação em fibroblastos, macrófagos, queratinócitos e melanócitos (CONSTANT et al., 2021; MONTEIRO et al., 2019; SILVA; DERMODY, 2017). Através dos vasos

linfáticos, o vírus se dissemina na corrente sanguínea atingindo diferentes locais que atuam como sítio de replicação. A exemplo, tem-se os órgãos linfóides (linfonodos e baço), pele e, principalmente, os tecidos onde predominam os sintomas da doença, como o músculo, articulações periféricas e tendões (GASQUE et al., 2016; SILVA; DERMODY, 2017). O CHIKV pode se replicar em fibroblastos sinoviais e musculares, macrófagos sinoviais, mioblastos, células satélites musculares, condrócitos e osteoblastos (**Figura 3B**) (GASQUE et al., 2016; HOARAU et al., 2010; HUSSAIN et al., 2016; LENTSCHER et al., 2020; OZDEN et al., 2007; PHUKLIA et al., 2013; POTT et al., 2021; SILVA; DERMODY, 2017).

A infecção aguda pelo CHIKV provoca uma resposta imune inata robusta, elevando os níveis de fatores de crescimento, diferentes quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, com um destaque para os níveis de IFN-I, um dos fatores determinantes para o controle da replicação viral e início da patogênese (SCHILTE et al., 2010; TENG et al., 2015; WAUQUIER et al., 2011). Os sintomas se iniciam, predominantemente, com febre alta ($>38^{\circ}\text{C}$) que pode durar até uma semana, erupção cutânea maculopapular e pruriginosa, cefaleia, conjuntivite, desconforto gastrointestinal, mialgia e uma poliartralgia grave e debilitante, bilateral e simétrica, acometendo principalmente punhos, tornozelos e falanges (GASQUE et al., 2016; SILVA; DERMODY, 2017). Embora o período de viremia desapareça em torno de 5 a 7 dias após a infecção, grande parte das pessoas acometidas apresentam persistência de manifestações reumáticas por meses ou anos, desenvolvendo assim a SRC. Alguns fatores de risco foram descritos como a idade (>45 anos), artropatia inflamatória crônica e gravidade dos sintomas durante a fase aguda (GASQUE et al., 2016; SILVA; DERMODY, 2017).

Na SRC, a maioria dos pacientes apresentam distúrbios musculoesqueléticos crônicos e, aproximadamente, 5% correspondem aos critérios de reumatismo inflamatório crônico, que pode ser destrutivo e deformante envolvendo distintos processos imunopatológicos (JAVELLE et al., 2015). Diferentes analitos solúveis podem ser associados à progressão e gravidade da doença tais como, níveis elevados de IL-1 β , IL-6 e MCP-1 (CHOW et al., 2011; NG et al., 2009), enquanto os níveis elevados de GM-CSF e, também, de IL-6 podem estar relacionados a processos artritogênicos.

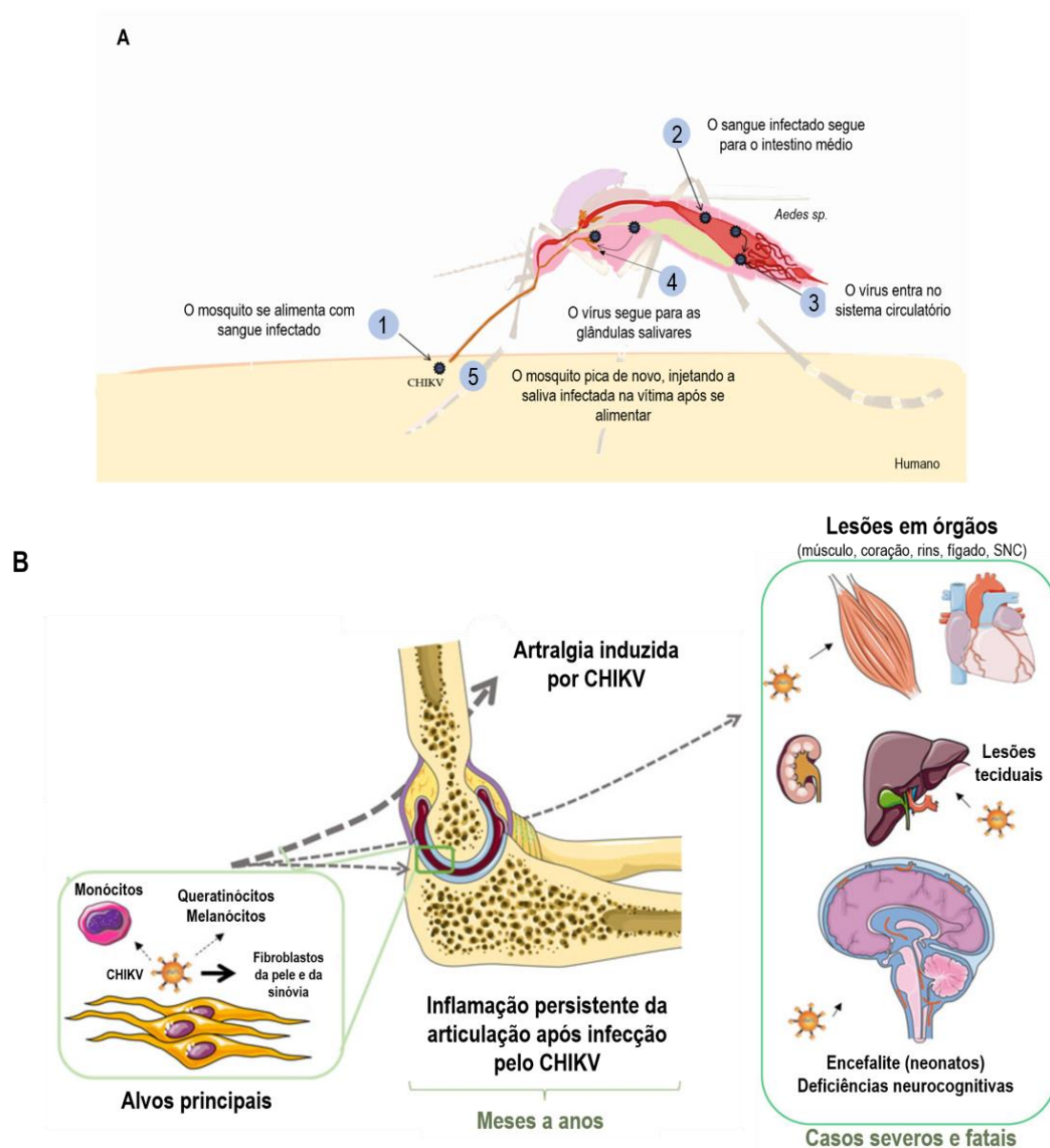


Figura 3. Infecção por *Aedes sp.* e principais células, tecidos e órgãos acometidos pelo CHIKV. (A) (1) O mosquito se alimenta de sangue infectado, ocorrendo o período de incubação no vetor e, depois, (2) o CHIKV infecta as células do intestino médio, (3) se replica e se dissemina para outros órgãos através do sistema circulatório, (4) até seguir para as glândulas salivares e, consequentemente, (5) picar o ser humano novamente e realizar o repasto sanguíneo. (B) Ao infectar o hospedeiro vertebrado, a resposta imune local é crítica, mas não impede que células como monócitos, queratinócitos, melanócitos, fibroblastos da pele e da sinóvia sejam acometidas, sendo o fibroblasto sinovial o principal alvo. O processo de infecção pode levar a artralgia induzida por CHIKV e consequente persistência da inflamação da articulação por meses a anos. Em casos severos, lesões em órgãos como o músculo, coração, rins, fígado e SNC podem ser fatais. Fonte: Adaptado de Gasque et al. (2016) e Monteiro et al. (2019).

2.2 HFLS – *Human Fibroblast-Like Synoviocytes*

2.2.1 Características dos HFLS

Os sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) são células que derivam de células-tronco mesenquimais e apresentam-se com uma forma alongada, fusiforme e com

prolongamentos citoplasmáticos que permitem a comunicação intercelular, além de apresentarem RER abundante (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). *In vitro*, é relatada uma alta expressão de colágenos tipo IV e V, vimentina, CD90, molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), CD44 e, principalmente, UDP-Glucose 6-dehydrogenase (UGDH) (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; EA; BAZILLE; LIOTÉ, 2008). A expressão desses fatores distingue os fibroblastos presentes na sinóvia (ou camada íntima) de fibroblastos presentes na camada subíntima, uma vez que estes não expressam essas moléculas (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; EA; BAZILLE; LIOTÉ, 2008).

A atividade enzimática de UGDH é maior em fibroblastos da camada íntima do que em qualquer outra célula presente nas camadas mais profundas da sinóvia (EDWARDS, 1995). O ácido hialurônico sintetizado por esta enzima é o principal constituinte do líquido sinovial e da matriz extracelular (MEC). Com relação à VCAM-1, acredita-se que esta molécula tenha papel fundamental na ligação de células mononucleares ao tecido sinovial ou ancorando FLS à fibronectina na MEC (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; EA; BAZILLE; LIOTÉ, 2008; EDWARDS, 1995). Além da VCAM-1, os FLS apresentam uma expressão basal proeminente de CD44, uma molécula de adesão que age como receptor de ácido hialurônico sintetizado por UGDH (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; EA; BAZILLE; LIOTÉ, 2008; EDWARDS, 1995).

Além disso, expressam outros tipos de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), integrinas $\beta 1$, CD55 (fator acelerador de decaimento, utilizado para identificar FLS em ensaios imunohistoquímicos) e caderina-11. Esta última é responsável pela agregação homotípica de FLS *in vitro* e *in vivo*, mantendo a integridade e organização da sinóvia (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; NOSS; BRENNER, 2008). Além disso, também atua regulando a secreção de IL-6, MCP-1, IL-8, dentre outras citocinas pró-inflamatórias (CHANG et al., 2011). É uma molécula descrita atuando em processos inflamatórios no tecido sinovial, como a AR (VALENCIA et al., 2004), tendo sido observada a presença de mRNA de caderina-11 em sangue periférico de pacientes com AR, com sinais clínicos de poliartrite, sugerindo que a caderina-11 pode ser utilizada como alvo terapêutico na AR (SFIKAKIS et al., 2014).

Para elucidar melhor o papel dos FLS na AR ou em outros processos patológicos, como a infecção pelo CHIKV, os HFLS (*Human Fibroblast-Like Synoviocytes*) são um

modelo de cultura celular primária comumente utilizado, tendo sido isolado do tecido sinovial de um humano saudável. O próximo tópico visa, então, relatar a interação deste tipo celular com o CHIKV e as principais alterações celulares induzidas nesta infecção.

2.2.2 Interação entre HFLS e o vírus Chikungunya

A infecção aguda por CHIKV causa uma febre severa, denominada CHIKF e sua principal característica é uma poliartralgia bilateral simétrica que pode se tornar crônica (SCHILTE et al., 2013). Para desenvolver um tratamento direcionado é preciso entender os mecanismos de interação vírus-hospedeiro que predominam no curso da doença.

Phuklia e colaboradores (2013) realizaram um estudo em cultura primária de HFLS infectados pelo CHIKV e observaram no sobrenadante de cultivo a alta expressão de citocinas como RANKL, IL-6, IL-8 e MCP-1. Os autores relatam então que, ao cultivar células primárias CD14⁺ com o sobrenadante de HFLS infectados por CHIKV, era observada a migração desse tipo celular. É sugerido então que essa atividade pode ser mediada pela alta secreção de IL-6 e RANKL nos sobrenadantes infectados (PHUKLIA et al., 2013). Além disso, esse estudo relata a diferenciação de monócitos/macrófagos em células semelhantes a osteoclastos, sendo um mecanismo que também pode ser regulado por IL-6 e RANKL. O sobrenadante de cultivo dessas células diferenciadas indicou altos níveis de IL-6 e TNF- α , que são citocinas constantemente produzidas no processo inflamatório, sendo fundamentais no desenvolvimento da AR (PHUKLIA et al., 2013).

Em outro estudo, foi observada a variação fenotípica do CHIKV através do ensaio de placa em células Vero. O sobrenadante de cultivo de células que produziram placas grandes e pequenas foi isolado e purificado e os HFLS então foram submetidos a infecção com essas duas variantes. Foi observado um efeito citopático (CPE) reduzido nos HFLS infectados com a variante de placas grandes quando comparado ao efeito produzido pela variante de placas pequenas, sugerindo que esta última apresenta uma alta infectividade (SUKKAEW et al., 2018). Em contrapartida, a variante de placas grandes induz uma maior produção de IL-6, IL-8 e MCP-1 em HFLS, enquanto a variante de placas pequenas não altera os níveis dessas citocinas. Além disso, a variante de placas grandes induziu a migração de células CD14⁺, quando estas foram infectadas com o sobrenadante de cultivo de HFLS. Esses resultados sugerem que esta variante em comparação com a variante de placas pequenas apresenta um papel crucial no desenvolvimento da poliartralgia na CHIKF (SUKKAEW et al., 2018).

Selvamani e colaboradores (2014) observaram que HFLS infectados pelo CHIKV apresentaram uma baixa expressão nos níveis das proteínas TRAF6, IRAK1, IRAK2 devido a expressão elevada do microRNA miR-146a. Os autores relatam que a infecção leva a regulação positiva de miR-146a através da ativação e sinalização de NF- κ B por citocinas pró-inflamatórias secretadas, o que pode gerar um loop de feedback negativo, regulando negativamente ainda mais a expressão de TRAF6, IRAK1 e IRAK2. Sendo assim, ocorre uma restrição da atividade de NF- κ B. Além disso, uma análise da replicação do CHIKV após alta expressão do miR-146a, sugere que este miRNA explora a repressão da atividade de NF- κ B em detrimento do aumento da replicação viral (SELVAMANI; MISHRA; SINGH, 2014). Recentemente, outro estudo também utilizou HFLS para descrever o perfil de alguns miRNAs expressos após infecção com CHIKV. Através de *microarray* e análises *in silico*, Agrawal e colaboradores (2019) detectaram 24 miRNAs diferentemente expressos (DEMs) que podem impactar na resposta inflamatória, na replicação e na persistência da infecção viral em HFLS através da supressão de seus genes-alvos a níveis pós-transcricionais (AGRAWAL et al., 2019).

Diante disso, observa-se perfis de modulação de citocinas, quimiocinas e de moléculas que degradam progressivamente a sinóvia durante o curso da infecção pelo CHIKV em HFLS, o que destaca esse modelo celular como promissor na percepção da evolução do processo artrítico, uma vez que é o tipo celular predominante na sinóvia pelo qual o CHIKV apresenta alto tropismo.

2.3 Propriedades biomecânicas celulares

As células são unidades biológicas complexas que interpretam estímulos físico-químicos e apresentam como resposta ativa o desencadeamento de reações biomecânicas (GALBRAITH; SHEETZ, 1998; HUANG; INGBER, 1999). São, por sua vez, um sistema hierárquico interdependente de moléculas e/ou agrupamentos moleculares, onde a vida celular depende das suas ordens de interação (WEISS, 1963). Os processos biológicos caracterizados por propriedades biomecânicas celulares são de extrema relevância para o seu desenvolvimento, envolvendo mecanismos como divisão, desenvolvimento, migração, diferenciação celular (DISCHER; MOONEY; ZANDSTRA, 2009; EGGERT; MITCHISON; FIELD, 2006; GARDEL et al., 2010; GUCK et al., 2010; PALUCH; HEISENBERG, 2009), motilidade e apoptose (GALBRAITH; SHEETZ, 1998; HUANG; INGBER, 1999). Esses processos regulam atividades biológicas como adesão, sinalização, vias bioquímicas e rotas metabólicas, sendo fundamentais na

coordenação de vias gênicas que atuam diretamente na homeostase celular e tecidual (MAMMOTO; INGBER, 2010; MIROSHNIKOVA et al., 2018).

A adesão e a migração celular podem ser impactadas pelo estresse provocado no microambiente por diferentes tipos ou estágios de doenças, manifestando-se de diferentes maneiras a depender do tipo celular afetado e da patogenia que alteram as propriedades biomecânicas da célula (MIERKE, 2020). Sabe-se que há uma conexão entre núcleo, citoesqueleto, membrana plasmática e a MEC (MIERKE, 2020) e que, propriedades como a rigidez nuclear e do citoesqueleto, atuam em conjunto regulando a organização espacial celular através da interação entre componentes nucleares e componentes do citoesqueleto, como os filamentos de actina (FISCHER; HAYN; MIERKE, 2020). Além disso, no citoesqueleto existem outras estruturas de interesse, dentre elas os filamentos intermediários e os microtúbulos (**Figura 4**) (BLANCHONIN et al., 2014).

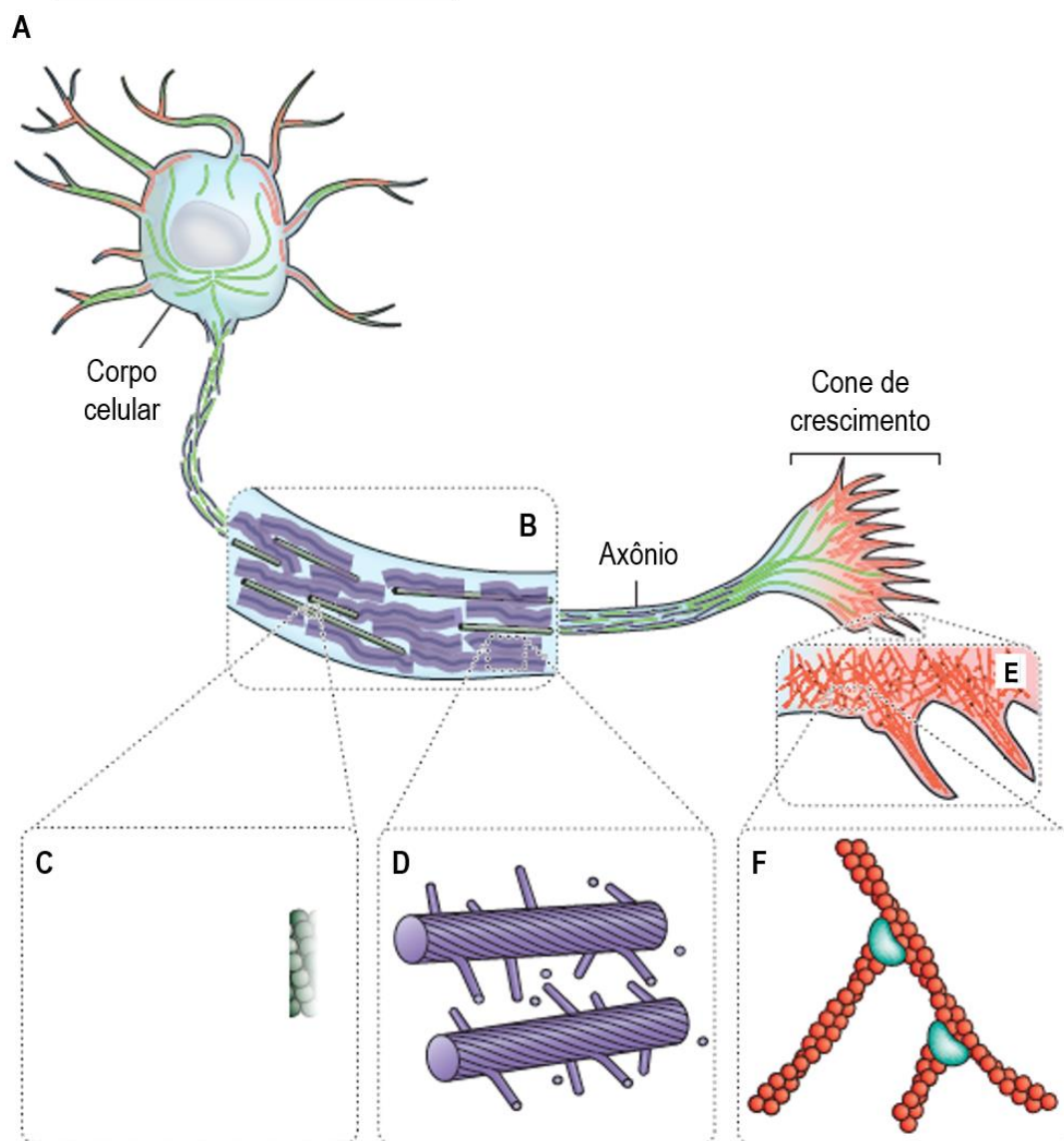


Figura 4. Elementos do citoesqueleto. (A) Célula eucariótica, aqui representada por um neurônio, realizando processo de alongamento citoplasmático para estabelecer conexões no sistema nervoso. (B) O axônio neuronal é composto por (C) microtúbulos e (D) neurofilamentos (ou filamentos intermediários). (E) O cone de crescimento neuronal contém (F) redes dendríticas de filamentos de actina e filopódios de filamentos de actina paralelos dispostos em redes de conexão. Fonte: Adaptado de Fletcher, D. A. e Mullins, R. D. (2010).

Os filamentos de actina são polímeros semiflexíveis com a capacidade de se organizarem em diferentes tipos de arquitetura. Exemplo disso são os elementos mecânicos que atuam na forma e motilidade celular, como as redes ramificadas e reticuladas, feixes paralelos e estruturas contráteis (BLANCHOIN et al., 2014). Os filamentos de actina cortical estão ancorados na parte interna da membrana plasmática e fornecem a capacidade contrátil do córtex atuando junto a miosina. O papel do córtex celular envolve mudanças na forma durante o movimento e estudos relatam que, à medida que a célula perde a sua morfologia inicial, o córtex se torna mais rígido, ajudando assim

na estabilidade. Esses mesmos estudos ainda sugerem que uma polimerização nos filamentos de actina cortical pode vir a ser responsável pela alteração da morfologia celular durante a migração (BLANCHOIN et al., 2014; DEVREOTES; HORWITZ, 2015; MORONE et al., 2006; SALBREUX; CHARRAS; PALUCH, 2012).

Quanto as fibras de estresse, estas são feixes grossos e longos, paralelos à direção do movimento de migração e compostas por filamentos de actina, proteínas de ligação e miosina II, que vão permitir que a migração celular ocorra (BLANCHOIN et al., 2014; DARLING et al., 2007; LI et al., 2008; TANG et al., 2014). Os filamentos intermediários, por sua vez, apresentam o papel na formação de lamelipódios e na regulação da migração celular. Esses filamentos intermediários também são necessários para a formação de microtúbulos e interações de microfilamentos (GRUENBAUM; AEBI, 2014). Os microtúbulos estão alocados por todo o citoplasma e também apresentam função na migração, assim como na sinalização e tráfego intercelular (ETIENNE-MANNEVILLE, 2013).

Os filamentos de actina tem sido associados à rigidez celular (LOUISE; ETIENNE; MARIE-PIERRE, 2014; MIHAI et al., 2012; POGODA et al., 2012; RAMOS et al., 2014; RODUIT et al., 2009), acreditando-se que a alteração do citoesqueleto pode ocasionar tal evento. Além disso, proteínas de ligação podem atuar regulando a rigidez celular de diferentes modos, sugerindo que a organização espacial dos filamentos de actina para formar o citoesqueleto podem vir a determinar a rigidez celular (SCHAEFER et al., 2014). O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica e adaptativa que integra a atividade de diversas proteínas e organelas citoplasmáticas com três funções principais: organizar espacialmente o conteúdo celular; conectar física e bioquimicamente a célula ao ambiente extracelular; e gerar forças coordenadas que permitam a motilidade e morfologia celular (FLETCHER; MULLINS, 2010). Os tipos de filamentos presentes no citoesqueleto são essenciais para mediar o sensoramento mecânico (DAHL; RIBEIRO; LAMMERDING, 2008). Além disso, o ligante de nucleoesqueleto e citoesqueleto (LINC) realiza a ancoragem do núcleo e permite que ele interaja com forças externas. As proteínas da membrana nuclear interna e as proteínas da membrana nuclear externa conectam o citoesqueleto e o núcleo (CRISP et al., 2006).

A estrutura do núcleo é dividida em três partes: envelope, lâmina e cromatina. O envelope, por sua vez, é subdividido em três estruturas: a membrana externa, a membrana interna nuclear e a membrana perinuclear (SCHIRMER; FOISNER, 2007). A membrana

externa apresenta em sua composição a proteína nesprina, envolvida na conexão entre o envelope nuclear e o citoesqueleto, promovendo a regulação da mecanossensação celular (SCHIRMER; FOISNER, 2007). A conexão entre a membrana externa e a membrana interna converge em complexos de poros nucleares (NPCs) por onde pequenas moléculas se difundem. Além disso, o espaço entre membrana externa e membrana interna é composto por uma estrutura determinada de lúmen ou membrana perinuclear (ROUT, 2003).

A membrana interna apresenta proteínas em sua composição que permitem a conexão entre citoplasma e cromatina, dentre elas as proteínas associadas a lâmina, que compõe a lâmina nuclear e estão envolvidas na regulação da expressão gênica (AEBI et al., 1986; FOISNER; GERACE, 1993; ZWERGER; HO; LAMMERDING, 2011). A redução na expressão de proteínas laminadas leva a desregulação do acoplamento do nucleoesqueleto e do citoesqueleto e, consequentemente, em falhas nas funções celulares como diferenciação, proliferação, reparação de danos intracelulares e sensibilização mecânica (ZWERGER; HO; LAMMERDING, 2011). A cromatina é classificada em eucromatina e heterocromatina, sendo esta última localizada no lúmen ou no núcleo, apresentando-se de forma compacta e com baixa expressão gênica. A eucromatina, por sua vez, é intranuclear e menos densa que a heterocromatina, possuindo uma alta atividade de expressão gênica. Por ser menos densa, a eucromatina está mais suscetível a deformações e a ser afetada por forças extracelulares (DAHL; RIBEIRO; LAMMERDING, 2008). Em geral, as propriedades mecânicas do núcleo são atribuídas a lâmina nuclear, devido a composição por proteínas incorporadas tanto a membrana nuclear quanto a cromatina, sendo associada a rigidez celular. É também atribuída a elasticidade e viscosidade celular que, uma vez afetadas, impactam na migração celular e mecanismos nucleares (PANORCHAN et al., 2004; SHIN et al., 2013; SWIFT et al., 2013).

Diferentes metodologias podem ser aplicadas para determinar as propriedades físicas do citoesqueleto e do núcleo. Dentre elas, destacam-se as metodologias de Microscopia de Força Atômica (MFA) e a espectroscopia Raman. A aplicação de MFA em estudos biológicos permite a obtenção de imagens tridimensionais da topografia celular (CHOI et al., 2014; NOTINGHER et al., 2003; PAPPAS, 2000). A aplicação dessa metodologia em estudos biomédicos vem ganhando cada vez mais impacto uma vez que fornece dados precisos da condição celular. Aliado a isso, a espectroscopia Raman

permite obter informações acerca da estrutura e função bioquímica celular, através de dados quantitativos precisos, com alta sensibilidade e seletividade (CHOI et al., 2014; NOTINGHER et al., 2003; PAPPAS, 2000). Informações intracelulares como a composição de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos são obtidas através da variância espectral e intensidade de fluorescência gerada pela incidência de um laser sobre a amostra de interesse. Assim, por meio destas metodologias, dados morfológicos, biomecânicos e físico-químicos das propriedades celulares podem ser avaliados em escalas nanométricas (CHOI et al., 2014; NOTINGHER et al., 2003; PAPPAS, 2000).

2.4 Aplicação de Microscopia de Força Atômica (MFA) e espectroscopia Raman em estudos biológicos

O crescente interesse biológico nas propriedades biomecânicas celulares tem ganhado força com a aplicação de técnicas como a MFA e a espectroscopia Raman (CHOI et al., 2014). A invenção da MFA é considerada um marco importante do desenvolvimento tecnológico, sendo comumente utilizada para análise de ultraestruturas e nanotecnologia, enquanto a espectroscopia Raman tem sido investigada como uma técnica biomédica e bioanalítica para aplicação em diagnóstico laboratorial (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986; CHOI et al., 2014; MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019; PAPPAS, 2000; RAMAN, 1928, 1930).

A MFA é uma técnica que se baseia na varredura da superfície de uma amostra utilizando uma sonda com uma ponta montada em um *cantilever* que, ao passo que este se movimenta, informações do seu desvio são geradas e ajustadas de acordo com a superfície da amostra através de um *scanner* piezoelétrico (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986; BUTT; CAPPELLA; KAPPL, 2005; CHOI et al., 2014). À medida que a ponta varre a superfície da amostra, ocorre a deflexão do *cantilever* em resoluções atômicas (CHOI et al., 2014), o que permite investigar a morfologia e as propriedades do material observado através da análise fractal, rugosidade e rigidez da amostra (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986; BUTT; CAPPELLA; KAPPL, 2005). Quando a ponta montada sob o *cantilever* interage com a superfície da amostra, forças de interação entre os átomos da ponta e os átomos da amostra são geradas, levando à deflexão do *cantilever*, desviando o *laser* que incide sobre ele, refletindo para um fotodetector e, assim, gerando informações topográficas sobre o material analisado (**Figura 5**). Todo o procedimento é controlado

por um computador que movimentará o *scanner* e armazenará os dados (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986; BUTT; CAPPELLA; KAPPL, 2005).

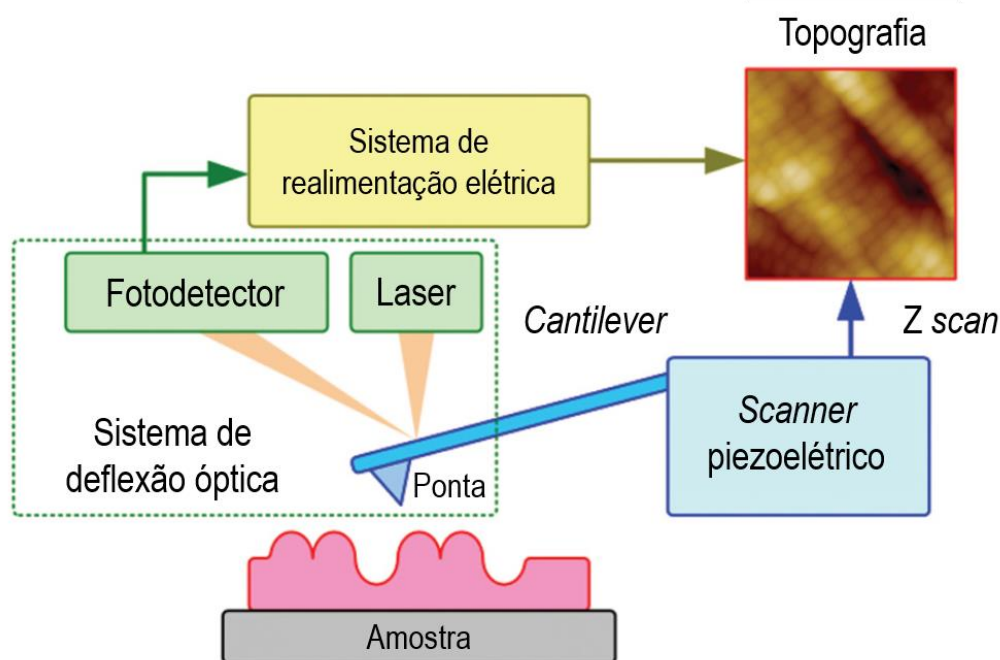


Figura 5. Diagrama esquemático de análise por MFA. O microscópio de força atômica consiste em quatro componentes principais: o *scanner* piezoelétrico, o sistema de deflexão óptica (composto pelo *cantilever*, ponta, fotodetector e *laser*) e o sistema de realimentação elétrica. O *scanner* movimenta o *cantilever* e, uma vez que a ponta interage com a superfície da amostra o sistema de deflexão desvia o *laser*, reflete no fotodetector e gera uma imagem topográfica da amostra analisada. Fonte: Adaptado de Choi et al. (2014).

Além de imagens topográficas, a MFA também pode gerar dados significativos sobre a estrutura e heterogeneidade celular (HUANG; KAMM; LEE, 2004). Esta técnica permite a detecção de propriedades biomecânicas como a rigidez celular por meio da medição do módulo elástico (HUANG; KAMM; LEE, 2004; ROTSCH et al., 1997). Conforme a ponta se movimenta para frente e para trás sobre a amostra, se deslocando horizontalmente, é possível se obter a rigidez local da superfície. O modelo mais utilizado para se medir o módulo elástico é o modelo de Hertz (HERTZ, 1881; HUANG; KAMM; LEE, 2004; MOEENDARBARY; HARRIS, 2014).

O módulo elástico, também chamado de módulo de Young, é uma propriedade que mede a rigidez da superfície celular, sendo utilizada como um indicador de elasticidade, uma vez que se baseia na força medida entre a ponta e a superfície da amostra (GARCIA; GUERRERO; GARCIA, 2020; LIU et al., 2012; RAMOS et al., 2014). A medida do módulo elástico consiste na indentação da ponta do MFA na superfície celular aderida em uma superfície rígida (vidro) denominada substrato, medindo assim a força e distância (profundidade) de penetração. Essa força promove então uma deflexão no *cantilever*, gerando assim gráficos de curvas força-distância (**Figura 6**) (GARCIA; GUERRERO; GARCIA, 2020; LIU et al., 2012; RAMOS et al., 2014). Essa propriedade pode alterar-se conforme a organização espacial e molecular da célula, que pode sofrer diferentes impactos (CODAN et al., 2014; LIU et al., 2018; SU et al., 2017; ZHOU et al., 2017) e assim alterar estruturas fundamentais para a manutenção da morfologia e de mecanismos de adesão e migração celular, como o citoesqueleto (GOLAN et al., 2018).

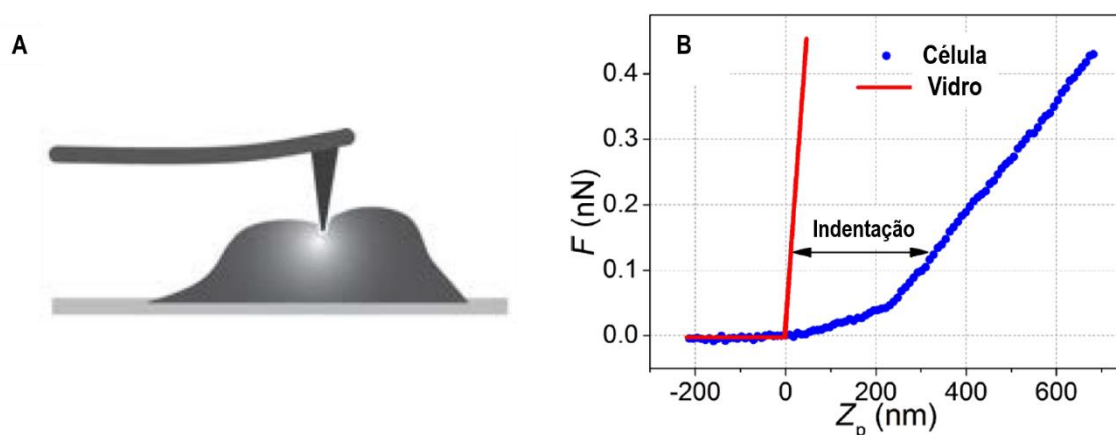


Figura 6. Medida do módulo elástico de Young. (A) Contato do *cantilever* e da ponta com a amostra para medição do módulo elástico. (B) Modelo de gráfico de curva força-distância de célula HT-1376 (carcinoma epitelial). A curva vermelha representa a curva da superfície de vidro como curva de calibração, enquanto a curva azul representa a curva correspondente a célula. A indentação é a diferença horizontal entre essas curvas. Fonte: Adaptado de Liu et al, (2012) e Ramos et al. (2014).

Em paralelo ao uso da MFA no estudo biológico, a aplicação da espectroscopia Raman pode ser valiosa para entender a estrutura e função de componentes bioquímicos celulares (CHOI et al., 2014). O fenômeno Raman foi descrito teoricamente por Smekal Raman em 1923 e comprovado experimentalmente em 1928, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de Física em 1930 (RAMAN, 1928, 1930). Raman observou através da utilização da luz do sol, uma rede de difração e uma fonte de excitação monocromática, a frequência da radiação incidente e da radiação espalhada, sendo esta última correspondente então ao modo ou frequência vibracional dos átomos do material analisado. Dessa forma, a

espectroscopia Raman mede a diferença de frequência entre dois estados de vibração (RAMAN, 1928, 1930).

A espectroscopia Raman apresenta inúmeras vantagens dentre as técnicas de espectroscopias vibracionais, uma vez que se baseia no espalhamento inelástico da luz e necessita de pouca ou quase nenhuma preparação da amostra e permite análises diretas e não destrutivas. Também pode ser avaliada em amostras contendo água e tanto em compostos inorgânicos como orgânicos (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019). Com o avanço da tecnologia, o primeiro espectrômetro comercial foi desenvolvido em 1953, utilizando um sistema de *lasers* e detectores, permitindo a expansão do uso desta técnica (MITSUTAKE; POPPI; BREITKREITZ, 2019). Dentre estes, a aplicação da espectroscopia Raman nos estudos biomédicos pode fornecer informações detalhadas sobre a composição química de células e tecidos, aplicações no diagnóstico médico, e na composição de nanotubos de carbono como biocondutores (ABRAMCZYK; KOPEC, 2017; CHOI et al., 2014; DRESSELHAUS et al., 2005; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; VERSIANI et al., 2017).

A forma como o espectro Raman é obtida ocorre através da excitação da amostra por uma fonte *laser*. O sinal proveniente dessa excitação é denominado sinal retroespalhado e é coletado por uma lente objetiva, sendo direcionado para o espectrômetro utilizando um sistema óptico de lentes e espelhos. A luz é coletada e filtrada, transmitindo-se apenas o sinal Raman incidente sobre a amostra (**Figura 7**) (BUTLER et al., 2016; SATO et al., 2019). O sinal Raman captado por um detector é convertido de uma intensidade de luz para sinais elétricos sob a forma de espectros Raman. Uma vez que o espectro Raman é um método de espalhamento da luz, a luz espalhada observada apresenta números de ondas específicos (*wavenumbers* em cm^{-1}) correspondentes a energia de transição da molécula, o que gera um padrão de banda específico. Sendo assim, os espectros Raman são coletivamente referidos como “região de impressão digital molecular”, apresentando padrões de bandas específicos e característicos de uma determinada molécula (BUTLER et al., 2016; SATO et al., 2019; SHIPP; SINJAB; NOTINGHER, 2017) (**Figura 8**). Apesar disso, a complexidade da composição molecular de amostras biológicas pode gerar bandas ou espectros sobrepostos, o que pode ocultar a informação de uma molécula específica, sendo o resultado obtido pelo espectro Raman diferente daquele obtido por biologia molecular convencional. Sendo assim, análises multivariadas se fazem necessárias para validar os

dados espectrais Raman, como o F-test, análise de PCA (*Principal Component Analysis*) ou análise de PLRS (*Partial Least Square Regression*) (ABDI; WILLIAMS, 2010; SATO et al., 2019).

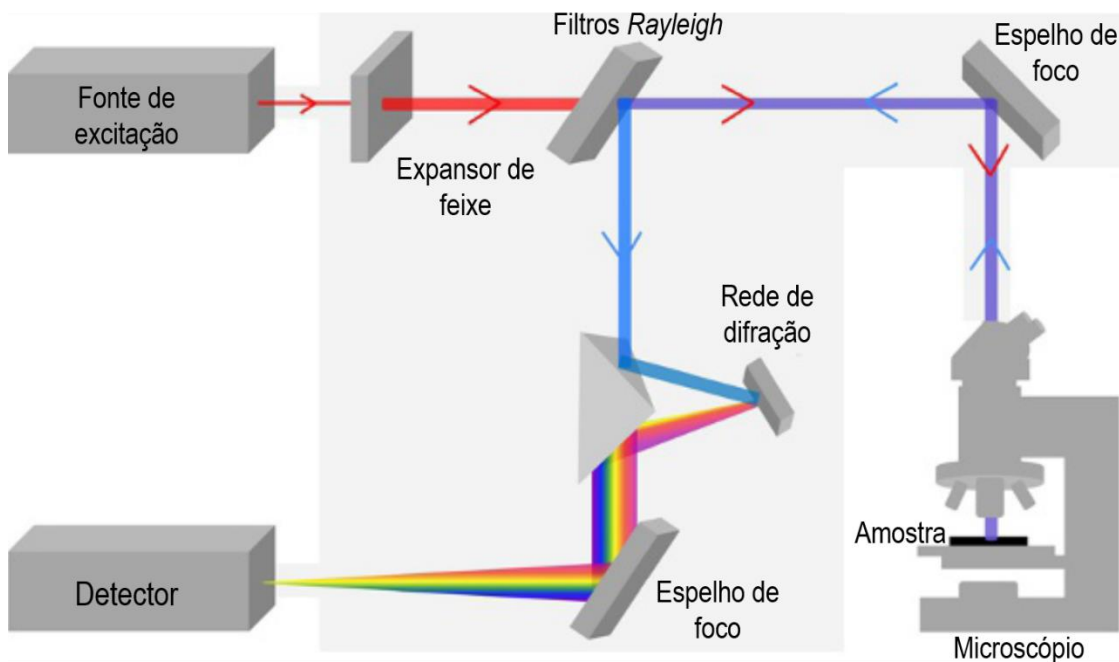


Figura 7. Sistema de microscópio e espectrômetro Raman. Visão geral da instrumentação de um sistema típico de microscópio acoplado ao espectrômetro Raman, apresentando fonte de excitação, expansor de feixe, filtros *Rayleigh*, espelho de foco, rede de difração, amostra, microscópio e detector. Os componentes ópticos podem variar de acordo com o fabricante. Fonte: Adaptado de Butler et al. (2016).

A composição molecular celular pode variar de acordo com qualquer alteração na sua estrutura ou função (SATO et al., 2019), no entanto as características espectrais mais comuns são causadas por modos vibracionais em moléculas de lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (SHIPP; SINJAB; NOTINGHER, 2017). Em geral, a região de impressão digital de amostras biológicas é dividida em três espectros, sendo a região de 600 a 1800 cm^{-1} a região mais significativa, gerando espectros nítidos e únicos, o que permite a classificação das biomoléculas presentes na amostra (**Figura 8**). Geralmente, os espectros vibracionais dessa região são compostos por átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio ou ligações de complexos de hidrogênio (SHIPP; SINJAB; NOTINGHER, 2017). Além disso, há também a região espectral de 1800 a 2500 cm^{-1} denominada como “região silenciosa”, uma vez que praticamente não há identificação de biomoléculas; e a “região de alto número de ondas”, abrangendo os espectros de 2500 a 3400 cm^{-1} , que engloba vibrações relacionadas a ligações de átomos de hidrogênio (SHIPP; SINJAB; NOTINGHER, 2017). Uma vez que a função celular está intimamente

relacionada com a sua composição molecular, a espectroscopia Raman tem se mostrado útil no estudo e monitoramento de amostras biológicas (SATO et al., 2019).

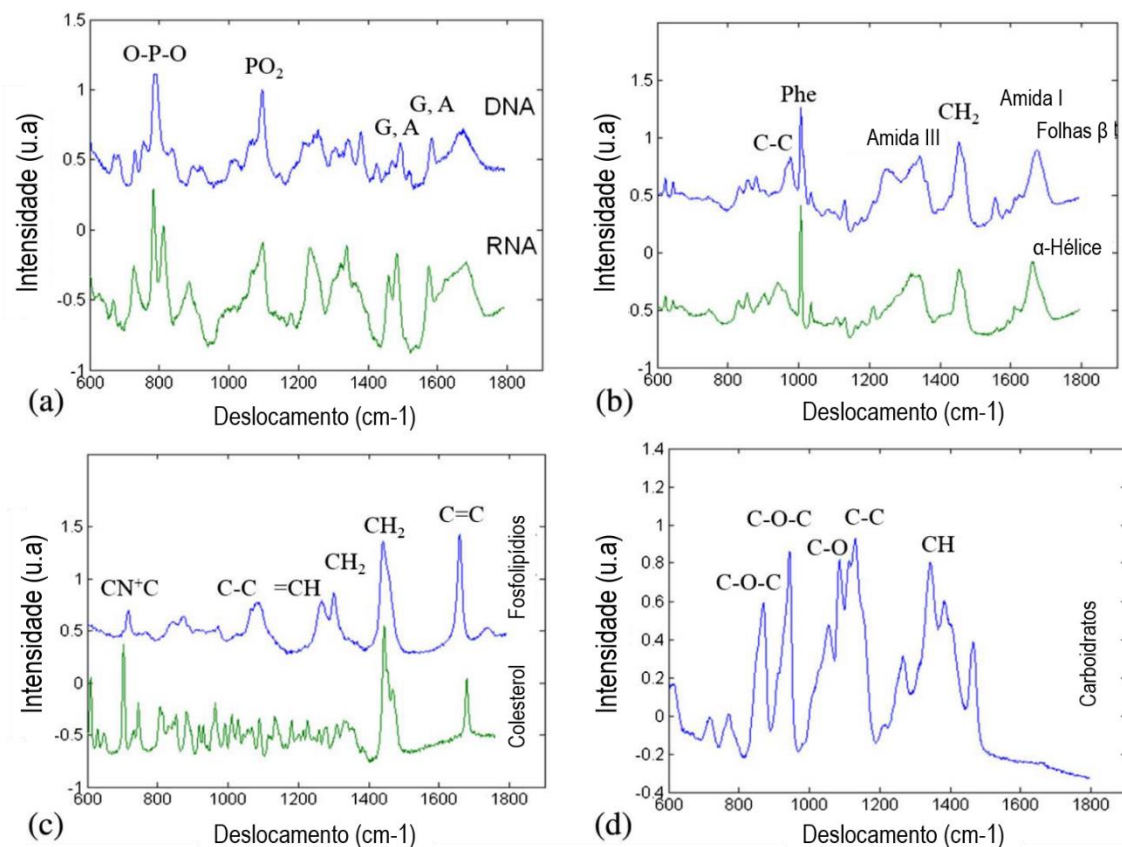


Figura 8. Espectros Raman típicos de material biológico na região de impressão digital. Espectros correspondentes a moléculas de (A) DNA e RNA, (B) proteínas, (C) lipídeos e (D) carboidratos. Fonte: Adaptado de Shipp et al. (2017).

Diante do exposto, a aplicação de metodologias como a MFA e a espectroscopia Raman no ramo biológico podem revelar mecanismos celulares ainda desconhecidos, abrindo a possibilidade para o entendimento de determinadas condições fisiológicas ou patológicas, unindo informações acerca de propriedades físicas e bioquímicas celulares (CHOI et al., 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Desde que foi descoberto em 1952, o CHIKV se tornou alvo de diversos estudos, devido a sua alta infectividade e fácil disseminação, principalmente após a sua chegada às Américas que culminou em diversos surtos epidêmicos (LEPARC-GOFFART et al., 2014; LUMSDEN, 1955). No Brasil, até a semana epidemiológica 42 do ano de 2022, foram confirmados 82 óbitos, e o número de casos prováveis aumentou em 84,8% quando comparado com o ano de 2021 no mesmo período analisado (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2022). Além disso, diversos casos de cronicidade da infecção foram relatados, com dores articulares agressivas, chegando a casos de invalidez e depressão (CAMPOS et al., 2013; SCHILTE et al., 2013). No entanto, pouco se conhece a respeito dos mecanismos de interação vírus-hospedeiro e processos celulares e moleculares envolvidos nesta infecção viral. Sendo assim, este estudo objetiva entender a interação do CHIKV com sinoviócitos semelhantes a fibroblastos humanos (HFLS) avaliando as alterações celulares biomecânicas, bioquímicas e moleculares decorrentes desta infecção viral.

4. HIPÓTESE

Diante do exposto, a hipótese deste trabalho é que a infecção pelo CHIKV promova alterações biomecânicas, bioquímicas e moleculares em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos humanos (HFLS) *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Analisar a morfologia celular e alterações biomecânicas, bioquímicas e moleculares de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (HFLS – *Human Fibroblast Like Synovocytes*) após a infecção pelo CHIKV *in vitro*.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar infecção de HFLS com CHIKV *in vitro* e confirmar a infecção através de citometria de fluxo, titulação por PFU em células Vero E6 do sobrenadante infectado e detecção do genoma viral por RT-PCR.
- Avaliar alterações biomecânicas e bioquímicas nos HFLS através de Microscopia de Força Atômica (MFA) e espectroscopia Raman;
- Avaliar alterações morfológicas e estruturais nos HFLS infectados pelo CHIKV;
- Avaliar a expressão relativa de genes envolvidos na homeostase da sinóvia e lubrificação da articulação;
- Detectar a modulação de quimiocinas envolvidas na patogênese da infecção pelo CHIKV no sobrenadante dos HFLS após estímulo viral;
- Relacionar as alterações biomecânicas e bioquímicas com as alterações na expressão gênica e modulação de quimiocinas decorrentes da infecção viral.

6. MATERIAS E MÉTODOS

6.1 Cultivo de HFLS e infecção com o CHIKV

As células HFLS (*Human Fibroblast-Like Synoviocytes*) foram adquiridas através da empresa *Cells Applications* (San Diego, USA) e foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% soro fetal bovino (SFB), 1% de solução antibiótica antimicótica PSA (*Penicillin, Streptomycin and Amphotericin B*) e 1% L-glutamina em placas de 24 poços até atingirem confluência. O vírus CHIKV foi obtido previamente em nosso laboratório a partir do soro de paciente positivo para esta arbovirose na fase virêmica da infecção (Projeto PPSUS/2016, GenBank: MF589171.1) (TANABE et al., 2018). O vírus foi titulado por unidades formadoras de placa (PFU) em células Vero E6, obtendo-se um título de $5,6 \times 10^7$ PFU/mL. O CHIKV foi adicionado aos HFLS com base na MOI (*Multiplicity of Infection*) determinada e as células foram mantidas por 2 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C para a adsorção viral, com homogeneização a cada 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80°C.

6.2 Determinação da MOI de infecção

Para determinar a MOI a ser utilizada nos experimentos, inicialmente foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) utilizando as MOIs 1, 0,5 e 0,1 do CHIKV. Para isso, foram semeadas 2×10^4 células por poço em placa de 96 poços e infectadas conforme a padronização prévia. Após 48h de infecção, foi adicionado 20 µL de MTT (5 mg/mL – Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) por poço e a placa foi incubada por 3h em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. Após as 3h, o sobrenadante foi retirado, sendo adicionado 150 µL de DMSO (Dimetilsufóxido) por 15 minutos, seguido de leitura no espectrofotômetro (Termo Plate®) em um comprimento de onda de 492nm. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo de porcentagem de viabilidade celular conforme a fórmula:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorbância\ da\ amostra - Absorbância\ do\ Controle\ Branco}{Absorbância\ do\ Controle\ Celular - Absorbância\ do\ Controle\ Branco}$$

6.3 Determinação da infecção viral

6.3.1 Citometria de fluxo

Para determinar a infecção celular pelo CHIKV, a citometria de fluxo foi utilizada para determinar a porcentagem de HFLS infectados, utilizando um anticorpo monoclonal específico para o CHIKV (clone A54Q, Thermo Scientific). Para fixar e permeabilizar os

HFLS, foi utilizado o tampão BD *Cytofix/Cytoperm Kit* (BD Biosciences, EUA), com um tempo de incubação de 20 min a 4°C. Após isso, o anticorpo anti-CHIKV foi adicionado, e as células foram incubadas por 1h a 4°C. Para a lavagem das células, foi utilizado o tampão de lavagem *Perm/Wash* (BD Biosciences, EUA). Foi então adicionado o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de camundongo conjugado ao Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), seguido de uma nova incubação por 1h a 4°C e uma nova lavagem. Após a última lavagem, a aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto II e a análise dos resultados realizada através do *software* FlowJo.

6.3.2 RT-PCR

A detecção do genoma do CHIKV no sobrenadante dos HFLS foi realizada através de RT-PCR. Inicialmente a extração do RNA viral foi realizada utilizando-se o kit *ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep System* (Promega) conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems), seguindo a ciclagem de 25°C/10 min; 37°C/120 min; e 85°C/5 min. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido no kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega), utilizando primers específicos para o genoma do CHIKV (**Tabela 1**), desenhados com o programa PRIMER3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). A reação ocorreu em 35 ciclos em condições de ciclagem de 95°C/5 min; 95°C/30s; 60°/30s; 72°C/30s; e 72°C/5min. O resultado foi observado através de radiação ultravioleta em gel de agarose 1,5% com tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) corado com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000 X.

Tabela 1 – Primers utilizados para transcrição de cDNA e amplificação da RT-PCR.

Primer	Região-alvo	Sequência 5'-3'	Amplicon (pb)
<i>P2_Forward</i>	E1: 251-403	AACATGCAGGGTGCCTAAAG	427
<i>P3_Reverse*</i>	E2: 93-393	AGCTCCTGGTGTCTAGTTCGT	

Legenda: *Para a transcrição reversa foi utilizado o primer *P3_Reverse*.

6.3.3 Determinação do título viral em células Vero E6 pelo ensaio de detecção de unidades formadoras de placas (PFUs)

O sobrenadante coletado dos HFLS 48h após a infecção viral foi utilizado na infecção de células Vero E6 para determinação do título viral (PFUs/mL). Para isso, foi realizada uma diluição seriada do sobrenadante (diluição 10^{-1} a 10^{-9}) dos HFLS. Foram adicionados 200 µL das diluições na monocamada de células Vero E6 confluentes em placa de 24 poços seguido de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas para

a adsorção viral, com homogeneização a cada 15 minutos. O meio de cultivo foi então removido seguido da adição de 1 mL do meio *overlay* (proporção de 1:1 de CMC 1% [carboximetilcelulose] + meio DMEM 2X [2% SFB e 1% PSA]). Após 48h, as células foram fixadas com formalina 10% durante 1 hora, seguido de lavagem e coloração com cristal violeta a 1%. O título viral foi determinado em PFU/mL de acordo com o protocolo estabelecido por Baer e Kehn-Hall (2014) utilizando a seguinte fórmula (BAER; KEHN-HALL, 2014):

$$PFU/mL = \frac{\text{Média de placas formadas}}{\text{Diluição} \times \text{Volume do inóculo}}$$

6.4 Microscopia de Força Atômica (MFA)

Os HFLS foram plaqueados em lamínulas de 13 mm posicionadas em placa de 24 poços em uma confluência de 1×10^4 células/poço para permitir a individualização entre as células. Após 24h, os HFLS foram infectados com CHIKV conforme a infecção padronizada previamente. Após 48h de infecção, foi adicionado glutaraldeído 0,5% gelado por 5 minutos. O glutaraldeído foi então removido e as lamínulas foram lavadas com PBS 1x gelado e secas para a leitura no Microscópio de Força Atômica (MFA).

As imagens da morfologia celular e as medidas do módulo elástico dos HFLS foram obtidas utilizando o Microscópio de Força Atômica (MFA) - Multiview 1000™, (Nanonics) acoplado ao microscópio óptico BXFM (Olympus). O sistema MFA foi isolado acusticamente para reduzir qualquer interferência do ruído ambiente durante as medições, e o instrumento foi fixado em uma mesa de amortecimento ativo para suprimir o ruído mecânico. A topografia celular foi fotografada no modo de contato intermitente com uma taxa de varredura de 0,3-1 Hz, e as imagens de MFA foram processadas com o *software* WSxM (HORCAS et al., 2007). As imagens foram realizadas utilizando uma ponta de varredura com um raio < 10 nm, um *cantilever* de 125 μm de comprimento, uma constante de mola entre 13–77 N/m e uma frequência nominal entre 200–400 kHz. Os experimentos de elasticidade foram realizados com uma ponta de varredura com raio de curvatura de 2,5 μm , *cantilever* de 100 μm de comprimento, constante de mola de 0,29 N/m e frequência nominal de 80 kHz. A constante de mola do *cantilever* foi calibrada ajustando o espectro de potência a um oscilador harmônico simples (BURNHAM et al., 2003) e uma força máxima de recuo para o *cantilever* foi definida em 20 nN. Todas as medições da curva força-distância foram realizadas movendo a ponta do *cantilever* em

direção à amostra com uma velocidade de carga constante de 5 $\mu\text{m/s}$ e o modelo de Hertz (HERTZ, 1881) foi utilizado para caracterizar as curvas força-distância a fim de se obter a indentação elástica das células e ajustar o modelo dos dados para calcular o módulo de Young médio das amostras. Todos os experimentos de curva força-distância foram realizados com a mesma ponta em 60 células de cada condição experimental (controle celular e CHIKV).

6.5 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos através do espectrômetro XploRA (Horiba) acoplado ao microscópio óptico BXFM (Olympus) e equipado com um laser de 532 nm e lentes objetivas de 50x. A mesma lente objetiva foi utilizada para coletar a luz de espalhamento Raman após a interação com a amostra, em uma geometria de retroespalhamento. A calibração da frequência foi realizada utilizando a banda vibracional de 520 cm^{-1} correspondente à amostra de referência de silício. Sob as mesmas condições, 50 espectros foram obtidos de cada condição celular (controle e CHIKV), medidos à temperatura ambiente. Uma irradiação de baixa potência (5Mw) na superfície das amostras foi realizada durante um curto período de exposição (1s de exposição para 15 acumulações, totalizando 15s), a fim de se minimizar o aquecimento induzido pelo laser. A rede de difração utilizada apresentava 1200 linhas/mm, rendendo uma resolução espectral de $1,5\text{ cm}^{-1}$.

Antes de processar os dados espectrais, estes foram suavizados, ajustados e normalizados ao fundo pela área, a fim de se reduzir ruído externo e de se obter dados fiéis da composição bioquímica celular. O processamento de dados foi realizado utilizando o algoritmo implementado no *software* MatLab (Mathworks, Naticks, MA) que escolhe automaticamente a ordem de ajuste polinomial para cada espectro Raman, com base na relação sinal-ruído para fluorescência, corrigindo os espectros de fundo sem exigir intervenção do usuário. A partir disso, os espectros de fundo foram obtidos para serem subtraídos dos espectros celulares, garantindo que o sinal medido seja atribuído apenas às células.

O *software* MatLab também foi utilizado para realizar a Análise de Componentes Principais (PCA) (ABDI; WILLIAMS, 2010) para avaliar as diferenças espectrais entre as células infectadas e não infectadas. Essa técnica multivariada transforma os dados originais em um conjunto de novas variáveis ortogonais chamadas de componentes

principais (PCs), que são responsáveis pela variação espectral significativa no conjunto de dados (FRANCO et al., 2017). Normalmente, a maior parte da variação está contida nos três primeiros componentes principais (PC1, PC2 e PC3). Através desse método, foi possível obter a variância total dos grupos celulares em gráficos de dispersão 3D, observando-se os picos alterados em cada PC. Um gráfico de dispersão em 2D entre PC1 e PC2 revelou a melhor separação entre os grupos celulares, sendo possível realizar a diferença na composição bioquímica entre controle celular e CHIKV através do espectro de PC2, que demonstrou a principal diferença espectral entre os grupos celulares.

6.6 Marcação de citoesqueleto por fluorescência

Os HFLS foram plaqueados em lamínulas de 13 mm posicionadas em placa de 24 poços em uma confluência de $1,5 \times 10^4$ células/poço para permitir a individualização entre as células. Após 24h, os HFLS foram infectados com CHIKV conforme a infecção padronizada previamente. Após 2h de adsorção viral, as células foram lavadas uma vez com PBS 1x e fixadas com 300 μ L PFA 4% por 10 minutos, fixando assim o tempo 0h de infecção. Após os 10 minutos de fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x por 5 minutos. A partir disso, o mesmo procedimento foi realizado nos tempos de 12h, 24h e 48h de infecção.

A permeabilização foi realizada com Triton X-100 a 0,5% em PBS 1X por 10 minutos, seguido de três lavagens por 5 minutos com PBS 1x. Após a permeabilização, foi realizado o bloqueio por 1h com 500 μ L de solução de BSA 3% em PBS 1X sob agitação. Foram então realizadas duas lavagens com PBS 1X por 5 minutos seguida de 1h de incubação com o reagente AlexaFluor™ 488 Phalloidin (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific) em uma diluição de 1:600, sob agitação e proteção da luz, para marcação do citoesqueleto (F-actina). Após a incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS 1X por 5 minutos e realizada a selagem das lamínulas em meio de montagem *ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI* (Thermo Fisher Scientific) para marcação do núcleo celular seguida de análise no microscópio EVOSM5000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, as imagens foram processadas através do algoritmo ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

6.7 Desenho de primers específicos para genes alvo

Com base na literatura, foram selecionados genes que poderiam ser modulados em HFLS após a infecção pelo CHIKV e assim desenhar primers específicos. Os genes

selecionados foram *MMP1*, *VEGFA* e *UGDH*. *MMP1* é membro da família de metaloproteínas responsáveis pela homeostase de tecidos, como o tecido sinovial, e a modulação da sua expressão tem sido observada em processos patológicos como a AR e a osteoartrite (MALEMUD, 2019; PÁSZTÓI et al., 2009; SHERVINGTON et al., 2018; SU et al., 2020; ZERROUK et al., 2020). *VEGFA* é responsável pela codificação de fatores de crescimento endoteliais. Têm sido associado a processos como a angiogênese na AR, promovendo danos no tecido sinovial e prolongando o processo inflamatório (BAKRY et al., 2022; DAI et al., 2019; HU et al., 2019; LI et al., 2020). *UGDH* atua na conversão de UDP-glicose em UDP-glicuronato, participando na síntese de ácido hialurônico, um glicosaminoglicano importante para a homeostase da sinóvia. Além disso, esse gene está envolvido na regulação do processo inflamatório provocado na osteoartrite (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; CLARKIN et al., 2011; EGGER et al., 2010; WEN et al., 2014). Diante destes fatores, os primers foram desenhados para as regiões de exons dos genes supracitados, utilizando o programa PRIMER3 (<https://primer3.ut.ee/>) e checados através do Primer-BLAST (YE et al., 2012), e através das bases de dados OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) e USCS Genome Browser – *In silico* PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). O gene *GAPDH* foi utilizado como gene endógeno da reação de qPCR, seguida de análise através do método $\Delta\Delta C_t$. A sequência dos primers utilizados e o tamanho do amplicon estão dispostos na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Sequência de primers para expressão gênica relativa através de RT-qPCR.

Primer	Sequência 5'-3'	Amplicon (pb)
<i>q_h_GAPDH_F</i> <i>q_h_GAPDH_R</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87 pb
<i>q_h_UGDH_F</i> <i>q_h_UGDH_R</i>	GCTGATGTAGAAGAGGTAGCAACA GCCTCACAGAGATAAACCAAATTC	134 pb
<i>q_h_VEGFA_F</i> <i>q_h_VEGFA_R</i>	CTTGCCTTGCTGCTCTACCT CGCTGATAGACATCCATGAACT	113 pb
<i>q_h_MMP1_F</i> <i>q_h_MMP1_R</i>	CATGCCATTGAGAAAGCCTTCC AGAGTTGTCCCGATGATCTCC	123 pb

Legenda: Azul: gene endógeno controle. Salmão: genes alvo.

6.8 Extração de RNA celular por TRIzol™

O RNA celular foi extraído de HFLS infectados e não infectados pelo CHIKV plaqueados na densidade de 2×10^5 células/poço em placas de 6 poços (constituindo 3 réplicas biológicas para o controle celular e 3 réplicas biológicas para CHIKV), utilizando

o reagente TRIzol™ (Invitrogen, ThermoScientific) de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, o lisado celular foi homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a dissociação completa de complexos de nucleoproteínas e posteriormente foi adicionado 200 µL de clorofórmio, seguido de precipitação por isopropanol 100% e etanol 75% e, por fim, eluição em 50 µL de H₂O *nuclease free*.

6.9 Quantificação do RNA por fluorimetria e avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

Após a extração, o RNA obtido foi então quantificado por fluorimetria através do fluorímetro Qubit™ 4 (Invitrogen, ThermoScientific), seguindo o protocolo padrão do kit *Qubit™ RNA XR Assay* (Invitrogen, ThermoScientific). Após a quantificação, a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando Random primers e 1 µg de RNA por reação para obtenção do cDNA, seguindo as recomendações do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (AppliedBiosystems). Para a PCR em tempo real (qPCR), foi utilizado o intercalante fluorescente SYBR® Green (Applied Biosystems) em placas de 96 poços *MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems). A reação foi realizada no termociclador de sistema óptico Applied Biosystems QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System, seguindo os parâmetros de reação do kit: 95°C/10 min para ativação da enzima – 95°C/15 s para a desnaturação – 60°C/1 min para anelamento de primers e extensão, totalizando 40 ciclos. As alterações na expressão gênica dos genes alvo foram avaliadas em relação aos valores limiar de ciclo (Ct) do gene endógeno através do método $\Delta\Delta CT$.

6.10 Quantificação de quimiocinas

As quimiocinas foram selecionadas com base em dados prévios da literatura, que destacam a relevância das mesmas na patogenia provocada pelo CHIKV, além de estarem associadas ao processo artritogênico (JACOB-NASCIMENTO et al., 2021; LOHACHANAKUL et al., 2012; PHUKLIA et al., 2013; POTT et al., 2021; SUKKAWEW et al., 2018; TANABE et al., 2019; WILSON et al., 2017). Desta forma, a quantificação de CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 no sobrenadante dos HFLS não infectados e infectados pelo CHIKV foi realizada pela metodologia de CBA - *Cytometric Bead Array* utilizando-se o *Human Chemokine Kit* (BD™ - Becton Dickinson Company) de acordo com recomendações do fabricante. Resumidamente, o sobrenadante foi incubado com populações de *beads* revestidas com

anticorpos de captura específicos para as quimiocinas citadas e com o anticorpo de detecção conjugado ao PE por 3 horas. Posteriormente as amostras foram lavadas com tampão de lavagem para retirar as *beads* que não se ligaram. Em seguida, as amostras foram fixadas e adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSVia. A análise dos dados foi realizada no *software* FCAP Array v.3.0.

6.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do *software* GraphPad Prism 6, utilizando o teste t de *Student* e/ou ANOVA (*One-way Analysis of Variance*) para os dados experimentais referentes ao teste MTT, citometria de fluxo e expressão gênica com o valor de p sendo considerado significativo quando $p \leq 0,5$. Para a MFA foi utilizado o *software* Origin, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov, e a significância estatística das diferenças no módulo elástico entre as células infectadas pelo CHIKV e não infectadas foi avaliada através de ANOVA, utilizando o teste *post-hoc* de Tukey, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

7. RESULTADOS

7.1 Determinação da MOI de infecção

Inicialmente, diferentes MOIs (1; 0,5 e 0,1) foram utilizadas na infecção dos HFLS seguido da análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT para padronização das condições ideais a serem utilizadas nos experimentos posteriores. As MOIs 1 e 0,5 reduziram a viabilidade celular em, aproximadamente, 20% (**Figura 9A**). Além disso, detectou-se um efeito citopático viral (ECV) evidente nas MOIs 1 e 0,5 (**Figura 9B**). Por outro lado, a MOI 0,1 não apresentou efeito citopático evidente e não reduziu a viabilidade celular comparado ao controle celular. Sendo assim, optou-se por utilizar a MOI 0,5 nos ensaios posteriores.

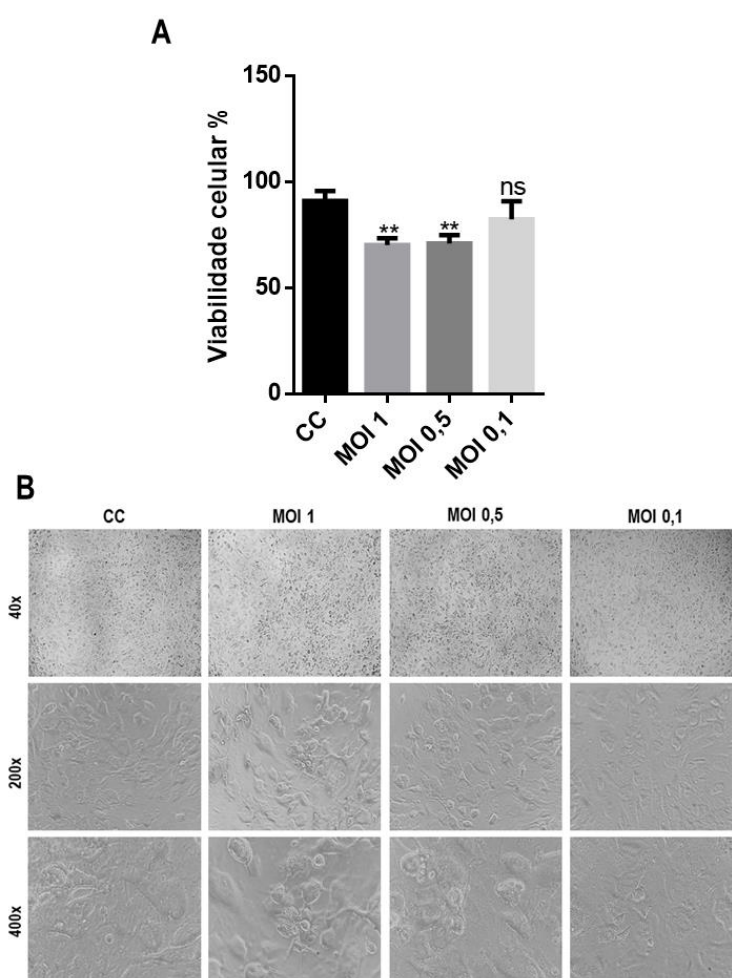


Figura 9. HFLS infectados por 48h com CHIKV em diferentes MOIs. Na figura **A**, o gráfico da viabilidade celular mostra que houve diferença estatística entre o controle celular e os controles infectados por CHIKV nas MOIs 1 e 0,5, enquanto a MOI 0,1 não apresentou diferença estatística. Na figura **B**, através da microscopia óptica, foi possível evidenciar a presença de efeito citopático viral (ECV) nas MOIs 1 e 0,5. Morfologicamente a célula se apresenta arredondada, refringente e vacuolizada, perdendo a sua morfologia alongada e fusiforme original, o que permite definir um

ECV evidente nos maiores aumentos (200x e 400x). Os dados foram avaliados estatisticamente por meio do teste ANOVA (** $p \leq 0,01$; ns = $p > 0,05$).

7.2 Confirmação da infecção viral por diferentes metodologias

Inicialmente, para confirmar a infecção celular pelo CHIKV utilizando a MOI 0,5, foi realizada uma citometria de fluxo intracelular para determinar a porcentagem de HFLS infectados após 48h de infecção. A **Figura 10A** apresenta os *dot plots* representativos da população de células analisadas. De acordo com o gráfico apresentado na **Figura 10B**, a média de porcentagem de células infectadas entre as triplicatas foi de 46,8%. As imagens obtidas por microscopia óptica representadas na **Figura 10C** evidenciam as alterações morfológicas celulares decorrentes da infecção viral onde os HFLS acabam perdendo a morfologia alongada e fusiforme e apresentam-se como células arredondadas, refringentes e vacuolizadas. Além disso, observou-se o desprendimento de uma fração das células da placa de cultivo.

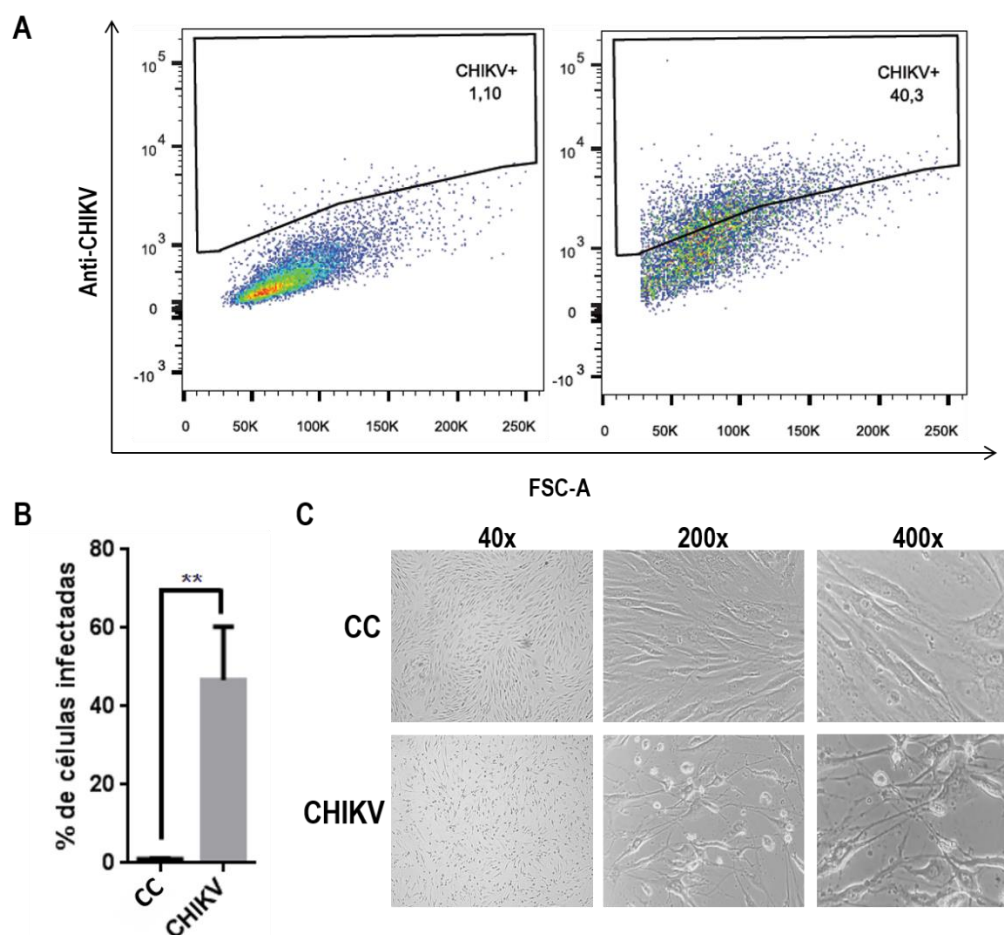


Figura 10. Análise da infecção em HFLS pelo CHIKV através de microscopia óptica e citometria de fluxo intracelular. A) *Dot plot* representativo da população analisada. **B)** Gráfico representativo da porcentagem de células infectadas, podendo-se observar que houve uma média de 46,8% de células positivas para o CHIKV. **C)** Microscopia óptica onde é possível evidenciar

o ECV, uma vez que os HFLS perdem sua forma alongada e fusiforme em detrimento da infecção, sendo possível observar nos maiores aumentos (200x e 400x) que a célula se encontra arredondada, refringente e vacuolizada. Os dados foram avaliados estatisticamente por meio do teste t de Student (** $p \leq 0,01$).

Além da citometria de fluxo, utilizando os sobrenadantes de cultivo dos controles infectado e não infectado como amostras, foi realizada uma RT-PCR convencional para amplificação de uma região alvo codificante para a proteína do envelope E2. De acordo com o programa PRIMER3, o *amplicon* apresenta um tamanho de 427 pares de base (pb). Conforme mostrado na **Figura 11**, detectou-se o amplicon dentro do tamanho esperado. A eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentou a formação de uma banda específica no *lane* 1, correspondente ao sobrenadante de cultivo de HFLS infectados pelo CHIKV. Já no *lane* 2, não há formação de banda, o que confirma que o sobrenadante de cultivo do controle celular não estava infectado. Os *lanes* 3 e 4 correspondem aos controles positivo e negativo da reação de PCR.

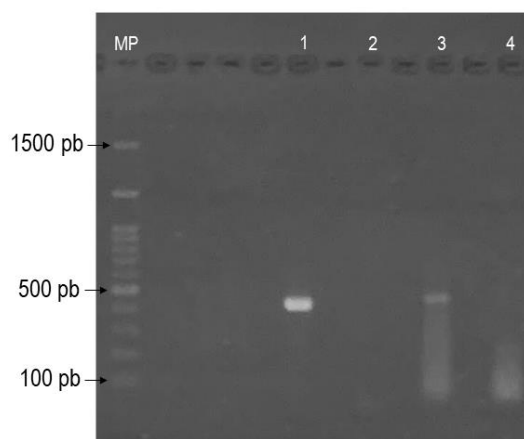


Figura 11. Confirmação da infecção pelo CHIKV em HFLS através de RT-PCR. Gel de agarose 1,5%, onde o *lane* 1 representa o sobrenadante de HFLS infectados pelo CHIKV e o *lane* 2 representa o controle negativo do sobrenadante de HFLS. Os *lanes* 3 e 4 representam, respectivamente, os controles positivo e negativo da reação. Ambas as amostras positivas representam uma banda de, aproximadamente, 427 pb. MP = Marcador de Peso Molecular (Kasvi).

Por fim, também foi observada a presença de partículas viáveis do CHIKV no sobrenadante dos HFLS após 48h por meio do ensaio de detecção de PFUs em células Vero E6. A **Figura 12A** apresenta uma imagem representativa de poços de cultivo de células Vero E6 após a infecção. A contagem das placas observadas na imagem foi realizada através da observação em estereomicroscópio e a média do título viral obtido foi de $1,13 \times 10^5$ PFU/mL (**Figura 12B**).

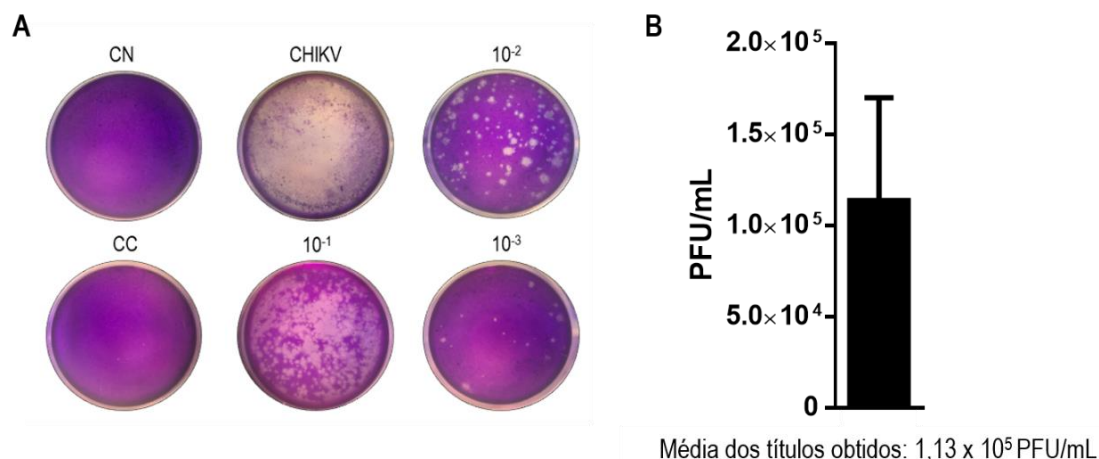


Figura 12. Determinação do título viral no sobrenadante de HFLS pelo ensaio de PFU em células Vero E6. (A) Imagem dos poços de cultivo de células Vero E6 após a coloração por cristal violeta evidenciando as unidades formadoras de placas em diferentes diluições do sobrenadante. Os controles CC, CN, e CHIKV correspondem, respectivamente, ao controle celular cultivado com meio DMEM *low* glicose; sobrenadante de HFLS não infectado; e sobrenadante de HFLS infectado com CHIKV e não diluído. (B) Média do título viral obtido ($1,13 \times 10^5$ PFU/mL) de duas réplicas biológicas. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média.

7.3 Alterações morfológicas, biomecânicas e bioquímicas através de MFA e espectroscopia Raman

A morfologia celular, incluindo as características da membrana e do citoplasma celular, pode ser observada nas imagens geradas por MFA (**Figura 13A e 13B**). A maioria dos HFLS não infectados apresentou formato alongado, fusiforme e superfície levemente rugosa, enquanto os HFLS infectados pelo CHIKV apresentaram alterações morfológicas diversas, perdendo o formato alongado e fusiforme, além de apresentarem uma superfície mais rugosa, corroborando com os resultados previamente apresentados de que a infecção pelo CHIKV induz alterações morfológicas nos HFLS.

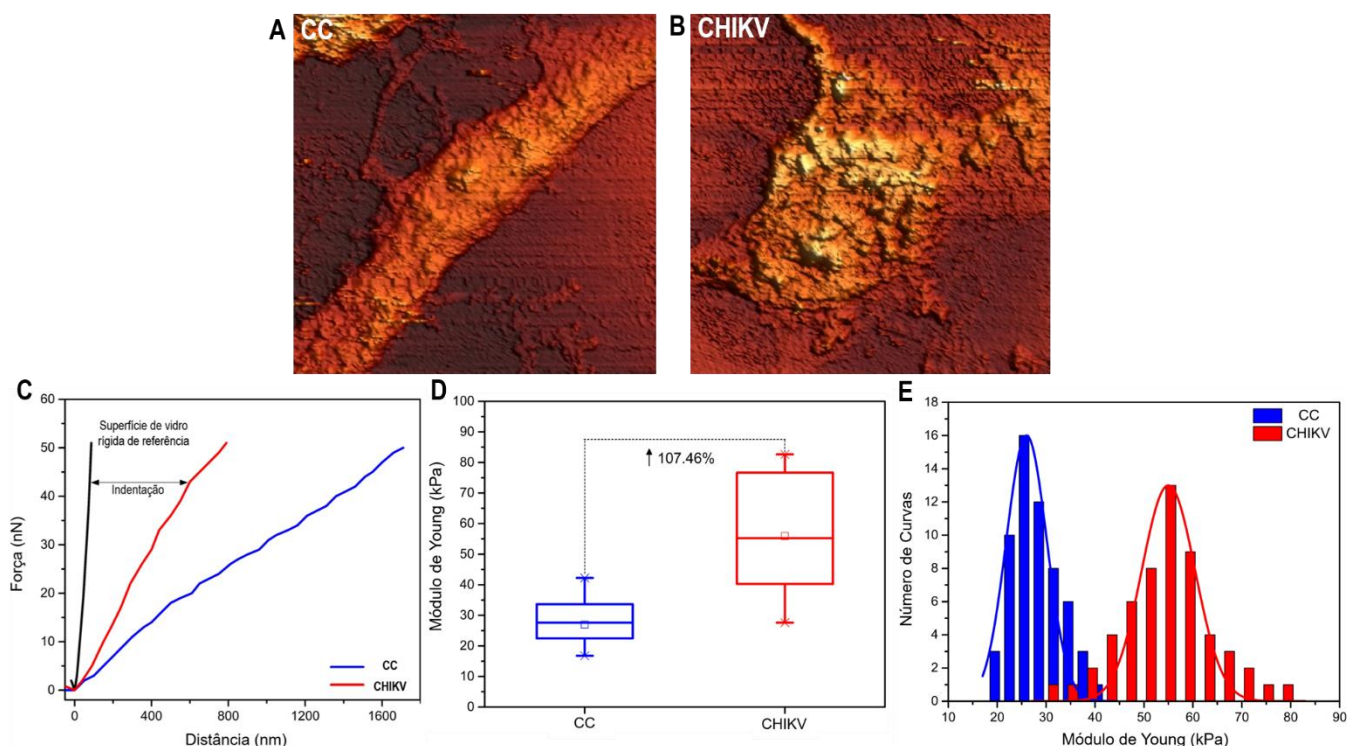


Figura 13. MFA de HFLS não infectados e infectados pelo CHIKV. (A) Imagem representativa do controle celular, gerada por MFA, indicando a forma fusiforme e alongada dos HFLS. (B) Imagem representativa de HFLS após infecção pelo CHIKV, gerada por MFA. (C) Gráfico representativo das curvas de força-distância segundo o modelo de Hertz. (D) Gráfico representativo do módulo de Young para cada condição experimental. Os HFLS não infectados exibiram um módulo médio de Young de $26,96 \pm 6,87$ kPa, enquanto o módulo médio de Young das células infectadas com CHIKV foi de $55,93 \pm 17,92$ kPa, revelando um aumento de 107,46%. (E) Gráfico representativo dos histogramas de distribuição dos valores do módulo de Young para cada condição experimental avaliada. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão (DP). Para mostrar que todos os dados estavam distribuídos normalmente, foi realizado um teste de Kolmogorov-Smirnov, e a significância estatística das diferenças no módulo de elasticidade entre os grupos de células foi avaliada com análise de variância (ANOVA) de uma via utilizando o teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). CC = controle celular (HFLS não infectados); CHIKV: HFLS infectados com CHIKV (MOI 0,5).

As medidas de nanoindentação por MFA foram usadas para avaliar os valores do módulo de Young dos HFLS. Para isso, ajustou-se o modelo de Hertz às curvas força-distância (**Figura 13C**). Como resultado, as células do controle não infectado exibiram um módulo de Young de $26,96 \pm 6,87$ kPa. Em contraste, o módulo médio de Young das células infectadas com CHIKV foi de $55,93 \pm 17,92$ kPa, revelando um aumento de 107,46% no módulo elástico médio em comparação com as células controle (**Figura 13D**). Os histogramas da distribuição dos valores do módulo de Young para as células apresentaram distribuição normal (**Figura 13E**).

Os HFLS foram analisados por espectroscopia Raman na faixa espectral de 600–1800 cm^{-1} , região de impressão digital do espectro Raman, significativa para avaliar o perfil das alterações bioquímicas em amostras biológicas. Para realizar a análise e classificação dos dados espectrais, foram obtidos os espectros Raman dos HFLS infectados por CHIKV e HFLS não infectados. A **Figura 14A** apresenta os espectros Raman médios dos grupos de células, com os respectivos desvios padrão sobrepostos como preenchimento cinza sombreado. As atribuições das bandas Raman utilizadas na interpretação das características espectrais foram realizadas com base em dados prévios da literatura e estão dispostas na **Tabela 2** (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007).

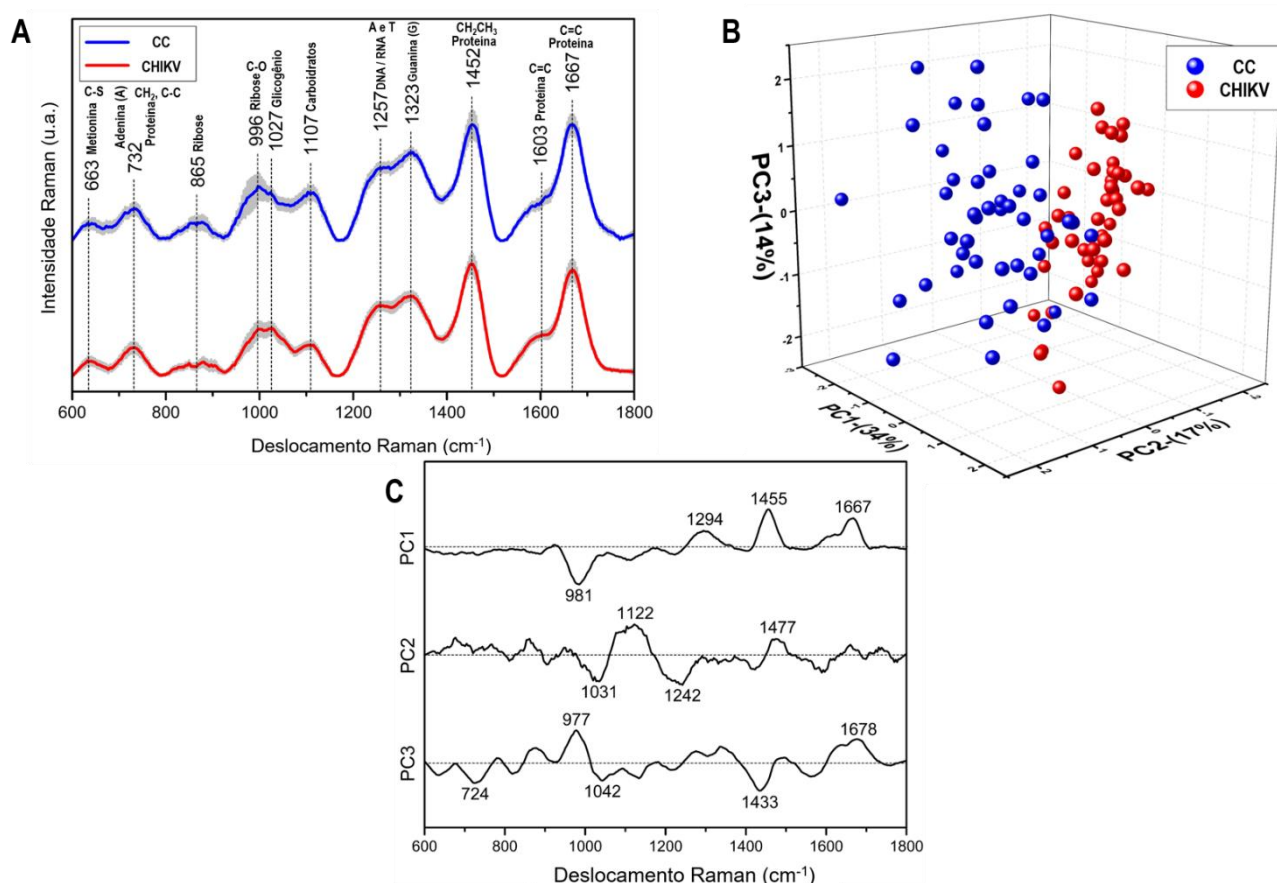


Figura 14. Espectrometria Raman de HFLS não infectados e infectados pelo CHIKV. (A) Espectros Raman médios de HFLS infectados pelo CHIKV (vermelho) e HFLS não infectados (azul). Os desvios padrão estão sobrepostos em cinza. (B) Análise de principais componentes (PCA) de HFLS infectados pelo CHIKV (pontos vermelhos) e HFLS não infectados (pontos azuis), demonstrando a alteração da composição bioquímica celular após a infecção. (C) Cargas de PCs de diferenças bioquímicas celulares em HFLS infectados pelo CHIKV e HFLS não infectados. A análise estatística multivariada foi implementada no software MatLab (Mathworks, Naticks, MA). CC = controle celular (HFLS não infectados); CHIKV: HFLS infectados com CHIKV (MOI 0,5).

Tabela 3 – Atribuições espectrais de Raman

Espectro cm^{-1}	Características espectrais
633 cm^{-1}	$\nu(\text{C-S})$ <i>gauche</i> (aminoácido metionina)
732 cm^{-1}	Adenina (ácidos nucleicos) / balanço CH_2 , C-C (proteínas)
865 cm^{-1}	Vibração de ribose (um dos modos distintos de RNA)
996 cm^{-1}	C-O ribose (carboidratos)
1027 cm^{-1}	Pico de carboidratos / glicogênio
1107 cm^{-1}	Pico de carboidratos
1257 cm^{-1}	Adenina e Timina (modo de respiração do anel das bases de DNA/RNA)
1323 cm^{-1}	Guanina (base púrica de DNA/RNA)
1452 cm^{-1}	Modificação de CH_2CH_3 (banda de proteína)
1603 cm^{-1}	C=C modo de dobramento no plano de fenilalanina e tirosina (banda de proteína)
1667 cm^{-1}	Banda de alongamento C=C (banda de proteína)

Fonte: Adaptado de Movasaghi; Rehman; Rehman, 2007.

A análise de principais componentes (PCA - *Principal Component Analysis*) foi utilizada para a classificação e interpretação dos dados espectrais do controle celular (CC) e dos HFLS infectados pelo CHIKV. Por meio desse método, foi possível fazer a comparação entre os grupos experimentais e observar uma diferença entre eles que comprova que a infecção, de fato, afetou a composição bioquímica celular. Conforme observado na **Figura 14B**, os HFLS não infectados (pontos azuis) podem ser distinguidos dos HFLS infectados pelo CHIKV (pontos vermelhos) pelos três primeiros PCs usados nesta comparação. Esses PCs foram responsáveis por 65% da variância total do conjunto de dados original, com PC1 descrevendo 34%; PC2 descrevendo 17%; e PC3 descrevendo 14% da variância total. Esses dados indicam que, mesmo nos grupos de células onde as características espectrais são bastante semelhantes, o PCA consegue classificar as amostras.

As cargas dos PCs são representativas das diferenças bioquímicas entre controle celular e HFLS infectados pelo CHIKV, e contribuem para a diferenciação dos espectros no gráfico de pontuação dos PCs, que podem ser observadas na **Figura 14C**. As cargas possuem uma dimensão espectral, onde podem ser observados picos positivos e negativos, que indicam aumento ou diminuição dos sinais de Raman, respectivamente. Os resultados demonstram então que, as cargas de PC1 indicaram correlação positiva das bandas Raman em 1294, 1455 e 1667 cm^{-1} , e correlação negativa dos sinais em 981 cm^{-1} para os HFLS infectados pelo CHIKV quando comparados aos HFLS do controle celular. Cargas de PC2 indicaram sinais de correlação positivos em 1122 e 1477 cm^{-1} , enquanto houve uma correlação negativa das bandas em 1031 e 1242 cm^{-1} . Uma correlação positiva em 977 e 1678 cm^{-1} e uma correlação negativa em 724, 1042 e 1433 cm^{-1} foram

identificados nas cargas de PC3. Os picos com cargas alteradas estão indicados na **Tabela 3** (com exceção dos picos 1433 e 1477 cm^{-1} , ainda não descritos na literatura).

Além disso, um gráfico de dispersão em 2D de PC1 e PC2 (**Figura 15A**) revelou a melhor separação entre os dois grupos celulares, sendo possível observar que, de fato, há uma alteração na composição bioquímica celular após a infecção. Diante disso, através de PC2 foi realizada a diferença de assinatura espectral que revelou a maioria das diferenças bioquímicas ocorridas após a infecção pelo CHIKV. As principais assinaturas bioquímicas identificadas estão descritas na **Tabela 3** de acordo com dados prévios estabelecidos na literatura (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; SHIPP; SINJAB; NOTINGHER, 2017) e indicadas na **Figura 15B**, sendo elas as bandas 795, 977, 1031, 1223, 1290, 1444, 1495, 1635, 1660 e 1709 cm^{-1} . A maioria das assinaturas espectrais das células infectadas pelo CHIKV estão relacionadas a alterações em amidas primárias e terciárias, folhas β , lipídeos e colágeno e estão destacadas em salmão na **Tabela 3**.

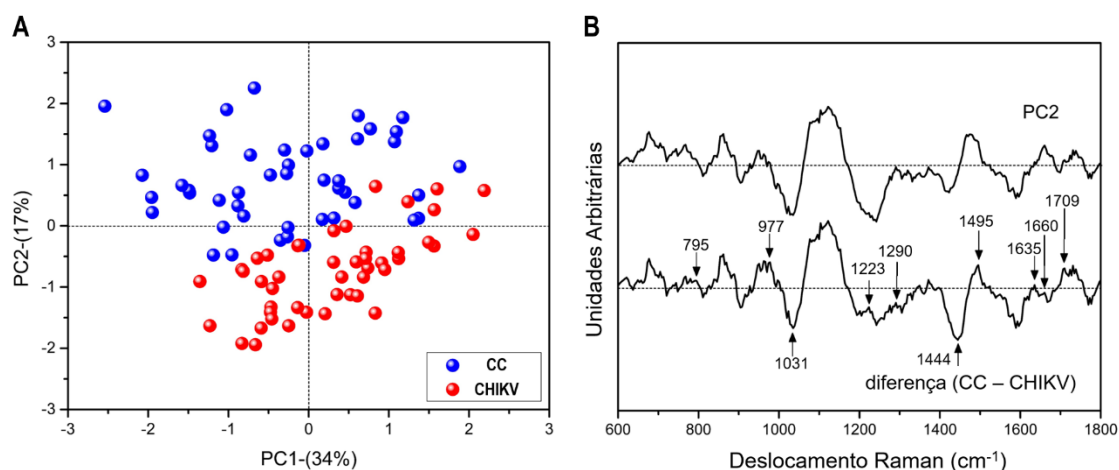


Figura 15. Diferença espectral entre controle celular e HFLS infectados pelo CHIKV. (A) Gráfico de dispersão em 2D obtido através da análise de PCA, demonstrando que a melhor separação entre os grupos celulares corresponde a PC1 vs PC2, indicando a alteração na composição bioquímica após infecção. (B) Espectro de PC2, demonstrando a maior diferença entre o controle celular e HFLS infectados pelo CHIKV. As principais alterações espectrais estão indicadas através de setas e as assinaturas dos picos alterados encontram-se na **Tabela 3**. A análise estatística multivariada foi implementada no software MatLab (Mathworks, Naticks, MA). CC = controle celular (HFLS não infectados); CHIKV: HFLS infectados com CHIKV (MOI 0,5).

Tabela 4 – Diferenças espectrais Raman entre CC e CHIKV

Espectro cm^{-1}	Características espectrais
724 cm^{-1}	Grupo principal C-N em Adenina (723 - 728 cm^{-1})* A (modo de respiração do anel de bases de DNA/RNA) (725 cm^{-1})*
795 cm^{-1}	Uracila, Citosina, e modo de respiração do anel de Timina (782-792 cm^{-1})*; Alongamento simétrico de O-P-O (782-792 cm^{-1})*;
977 cm^{-1} 981 cm^{-1}	Vibração de ribose, um dos modos distintos de RNA (974 cm^{-1})*; Alongamento da ligação C-C em Folha β (proteínas) (980 cm^{-1})*; Curvatura CH (lipídios) (980 cm^{-1})*;
1031 cm^{-1}	$\delta(\text{C-H})$, fenilalanina (atribuição de proteína); Modo de flexão no plano C-H da fenilalanina; Resíduos de carboidratos de colágeno; Fenilalanina, alongamento C-N de proteínas; Modo de flexão no plano C-H da fenilalanina;
1042 cm^{-1}	Esqueleto C-C (1030 - 1040 cm^{-1})* Prolina = atribuição de colágeno (1043 cm^{-1})*
1122 cm^{-1}	$\nu_s(\text{CC})$ esquelético $\nu(\text{C-C})$ trans
1223 cm^{-1} 1242 cm^{-1}	(PO_2^-): ácidos nucleicos; Ácidos nucleicos; Proteínas, incluindo colágeno I; Amida III: estrutura de Folha β (1224 cm^{-1})*; Amida III: Folha β e bobinas aleatórias (1242 cm^{-1}); Amida III (1225 - 1240 cm^{-1})*;
1290 cm^{-1}	Citosina; Curvatura C-H;
1294 cm^{-1}	CH_2 (1295 cm^{-1})*
1444 cm^{-1}	Banda de colesterol (associada ao espectro aterosclerótico); (CH_2), lipídios, ácidos graxos;
1455 cm^{-1}	Desoxirribose $\delta(\text{CH}_2)$
1495 cm^{-1}	DNA (1490 cm^{-1})*; Vibração de alongamento C-N acoplada ao plano (1491 cm^{-1})*; Curvatura C-H em cátions de radicais amino (1491 cm^{-1})*;
1635 cm^{-1}	Diferenças no conteúdo de colágeno;
1660 cm^{-1}	Amida I; Modo de vibração de amida I de proteínas estruturais; $\nu(\text{C=C})$ cis, lipídios, ácidos graxos Grupos C=C em ácidos graxos insaturados; Lipídeos; Timina, Guanina e Citosina (1659–1671 cm^{-1})*
1667 cm^{-1}	Banda de proteína Faixa de alongamento C=C Estrutura helicoidal da amida I Estiramento de carbonila (C=O)
1678 cm^{-1}	NADH livre e/ou ligado
1709 cm^{-1}	$\nu(\text{C=O})\text{OH}$ (aminoácidos aspartato e ácido glutâmico);

Fonte: Adaptado de Movasaghi; Rehman; Rehman, 2007 e Shipp; Sinjab; Nothinger, 2017.

Legenda: * = faixa espectral próxima, podendo variar de 2 a 4 cm^{-1} ; Salmão = principais picos de interesse biológico alterados na infecção pelo CHIKV.

7.4 Fluorescência do citoesqueleto

Por meio da marcação de filamentos de F-actina por faloidina conjugada ao fluorocromo AlexaFluor 488, foi possível evidenciar após 12h de infecção a alteração no citoesqueleto celular (**Figura 16**). As principais alterações observadas foram a ruptura dos filamentos de F-actina, e consequente ruptura e desorganização do citoesqueleto, alterando assim a morfologia inicial fibroblastoide observada no controle celular (CC). Tais resultados corroboram com as alterações no módulo elástico de Young induzidas pela infecção pelo CHIKV.

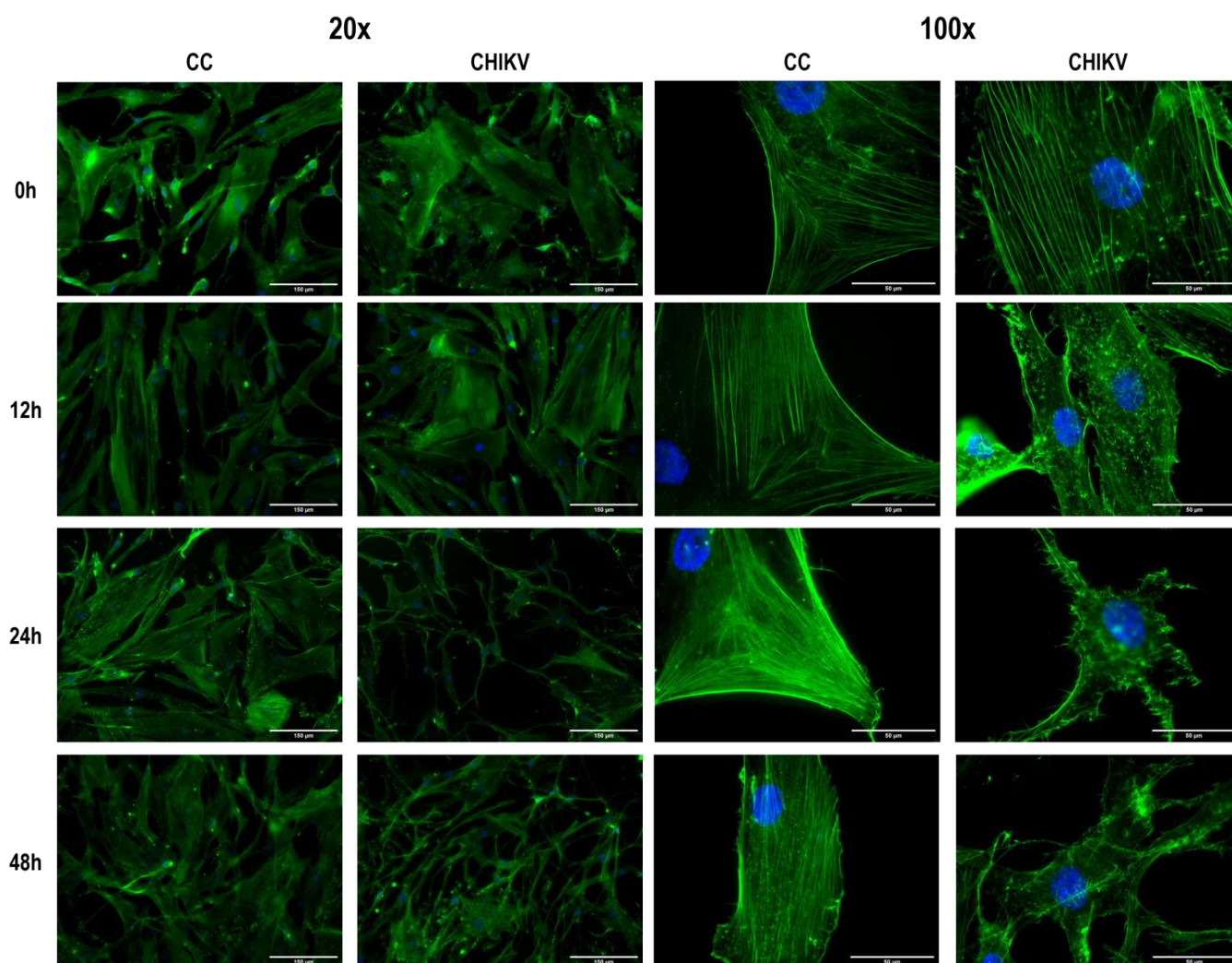


Figura 16. Fluorescência de citoesqueleto (F-actina) de HFLS infectados pelo CHIKV. Filamentos de F-actina foram marcados com faloidina conjugada a AlexaFluor 488 (em verde), enquanto o núcleo foi marcado com DAPI (em azul). No controle celular (CC), é possível observar a integridade do citoesqueleto nos aumentos de 20x e 100x nos diferentes tempos de infecção. Em contrapartida, a partir de 12h de infecção é possível observar o rompimento dos filamentos de F-actina e desorganização citoplasmática, alterando-se assim a morfologia inicial. As imagens foram processadas através do algoritmo ImageJ. As barras de escala indicam 150 μm (20x) e 50 μm (100x).

7.5 Avaliação da expressão gênica

Os genes previamente selecionados foram avaliados através da expressão relativa por qPCR utilizando como controle endógeno (*housekeeping*) o gene *GAPDH* e análise pelo método $\Delta\Delta C_t$. Conforme mostrado na **Figura 17**, verificou-se um aumento significativo na expressão dos genes *MMP1*, *VEGFA* e *UGDH* 48h após a infecção viral quando comparado ao controle celular (CC).

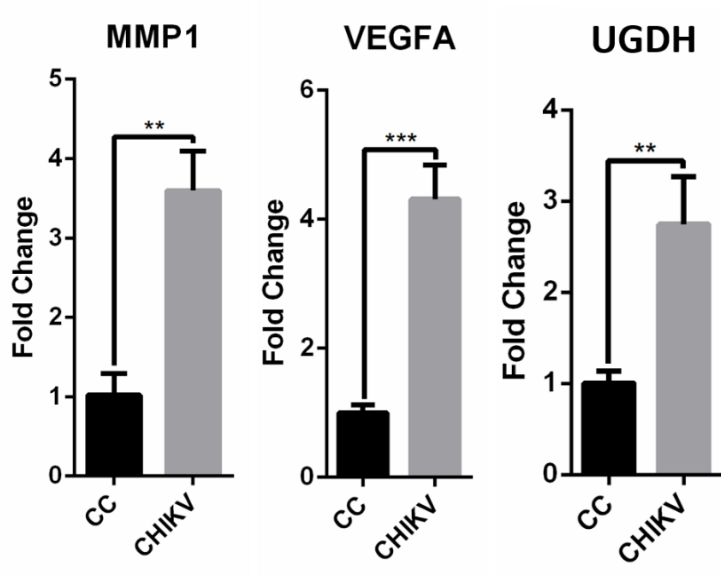


Figura 17. Expressão relativa de genes em HFLS infectados pelo CHIKV. *MMP1*, *VEGFA* e *UGDH* apresentaram um aumento de expressão 48h após a infecção. Os dados foram avaliados estatisticamente por meio do teste t de Student (*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$).

7.6 Quantificação de quimiocinas

As quimiocinas CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 foram quantificadas no sobrenadante de cultivo celular de HFLS infectados e não infectados com o CHIKV. Como resultado, detectou-se um aumento significativo de IP-10 e uma redução de MCP-1 48h após a infecção viral (**Figura 18**). A média da concentração de MIG nas amostras testadas apresentou-se abaixo de limite de detecção do kit de CBA utilizado e não houve diferença estatística significativa para os níveis de RANTES e IL-8 (**Figura 18**).

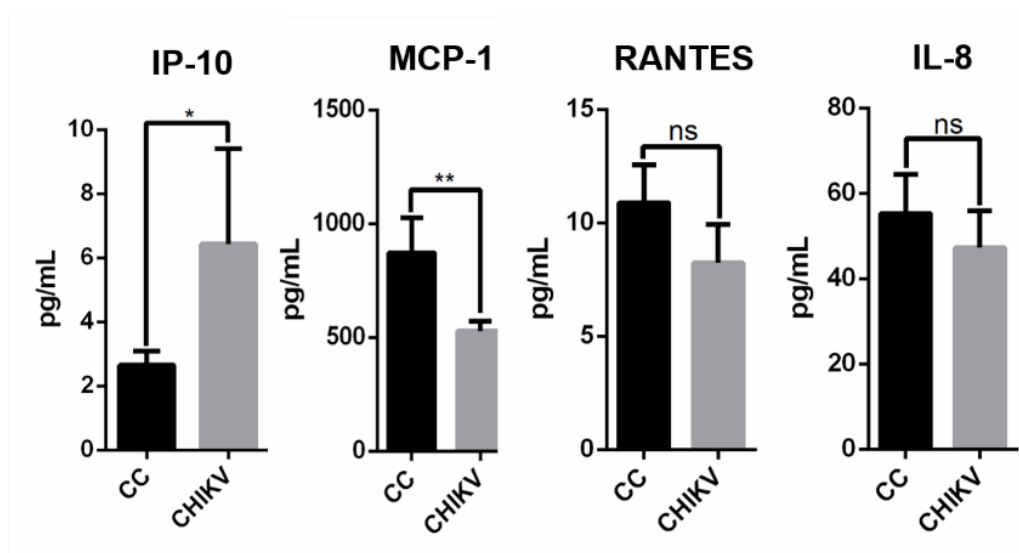


Figura 18. Modulação de quimiocinas em HFLS após infecção pelo CHIKV. Os dados foram avaliados estatisticamente por meio do teste t de Student (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; ns = $p > 0,05$).

8. DISCUSSÃO

O CHIKV é um arbovírus artritogênico, responsável por epidemias recorrentes em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, se tornando uma das arboviroses mais relevantes no contexto de saúde pública. A infecção por esse vírus é marcada por uma poliartralgia severa, podendo progredir da fase aguda para uma fase crônica de duração indeterminada, variando de semanas a anos. Além disso, casos atípicos podem levar a falência múltipla dos órgãos e a morte (CONSTANT et al., 2021). Apesar disso, ainda não existem vacinas e antivirais específicos contra o CHIKV e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na interação vírus-hospedeiro ainda não foram completamente elucidados.

O CHIKV apresenta amplo tropismo celular, podendo acometer diferentes tipos celulares, tecidos e órgãos. A infecção viral progride com altos títulos virais, sendo o tropismo fundamental para que esta se perpetue e estabeleça o curso da doença, infectando assim diversos tipos celulares (CONSTANT et al., 2021). Uma vez que o mecanismo de entrada se dá através da picada de fêmeas hematófagas do gênero *Aedes* sp. (GASQUE et al., 2016; SILVA; DERMODY, 2017), células epiteliais podem ser acometidas, permitindo que o vírus entre na corrente sanguínea e no sistema linfático e, assim, atingindo sítios ativos de replicação, como as articulações (EKCHARIYAWAT et al., 2015; PHUKLIA et al., 2013; SOURISSEAU et al., 2007; SUKKAEW et al., 2018). Uma vez nas articulações, o CHIKV pode acometer sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (HFLS) (PHUKLIA et al., 2013; SUKKAEW et al., 2018), podendo vir a conduzir a infecção a um processo inflamatório semelhante ao da AR (SILVA; DERMODY, 2017). Entender como ocorre a interação vírus-hospedeiro que leva ao processo artritogênico é de fundamental importância para compreensão da imunopatologia envolvida e direcionar possíveis tratamentos contra o CHIKV.

Tendo em vista a possível interação dos sinoviócitos semelhantes a fibroblastos com o CHIKV, neste estudo, foram utilizados os sinoviócitos semelhantes a fibroblastos humanos (HFLS, do inglês, “*human fibroblast-like synoviocytes*”) como modelo experimental de infecção viral. Previamente, foi reportado que os HFLS são infectados pelo CHIKV (PHUKLIA et al., 2013; SUKKAEW et al., 2018), tornando-se o modelo de escolha para o desenvolvimento do presente trabalho.

Inicialmente, para determinar se os HFLS seriam suscetíveis a infecção pelo CHIKV e se essa infecção seria passível de produzir partículas virais detectáveis e viáveis, diferentes ensaios foram realizados. Primeiro, a MOI utilizada ao longo do trabalho foi selecionada através da análise de viabilidade celular no ensaio de MTT e pela observação do ECV através de microscopia óptica. Phuklia e colaboradores (2013) padronizaram a infecção pelo CHIKV em HFLS, observando um ECV onde há perda da morfologia fibroblastoide original, com as células se apresentando arredondas, vacuolizadas, refringentes e levando a um consequente desprendimento da monocamada de cultivo e morte celular (PHUKLIA et al., 2013). Neste estudo, evidenciou-se esse ECV característico nos HFLS 48h após a infecção pelo CHIKV (**Figura 9B** e **Figura 10B**) e a MOI selecionada para os experimentos seguintes foi a MOI 0,5. Além disso, consistente com estudos prévios (PHUKLIA et al., 2013; SUKKAEW et al., 2018), os HFLS se mostraram suscetíveis a infecção pelo CHIKV, liberando partículas virais viáveis no sobrenadante (**Figuras 10A, 10C, 11 e 12**).

Neste estudo, ensaios de MFA foram realizados para determinar alterações biomecânicas em HFLS infectados pelo CHIKV onde verificou-se aumento de 107,46% no módulo elástico médio (ou módulo de Young). As alterações no módulo de Young podem estar relacionadas com o estresse celular, levando ao dano do citoesqueleto e das suas principais estruturas: fibras de actina, fibras intermediárias e microtúbulos (PASTRANA et al., 2019), sendo estas estruturas associadas à rigidez celular, uma vez que o citoesqueleto pode se reorganizar espacialmente diante de determinadas situações (LUO et al., 2016). A rigidez celular é uma propriedade biofísica celular importante, sendo utilizada como um indicador da função e estado celular. Além disso, alterações nesta propriedade podem estar associadas a indução do processo apoptótico (SU et al., 2017). Sendo assim, utilizar a MFA para medir os parâmetros de rigidez celular pode ser útil para se ter um panorama da situação celular em determinada condição patológica. Diante de tais resultados, o presente trabalho teve como um dos objetivos identificar alterações no citoesqueleto que poderiam impactar no módulo elástico médio e, consequentemente, na rigidez celular. Como observado na **Figura 16**, os filamentos de F-actina marcados através de fluorescência apresentam ruptura após 12h de infecção, levando ao consequente desarranjo do citoesqueleto, o que condiz com a alteração no módulo de Young detectada em HFLS infectados pelo CHIKV.

Em um modelo experimental de artrite reumatóide (AR) em camundongo DBA1, Lee e colaboradores (2015) observaram através de MFA alterações morfológicas e um aumento na rugosidade da superfície celular de FLS isolados da articulação sinovial. Além disso, o aumento da rugosidade se tornou mais evidente na 8ª semana de vida quando comparada a 5ª semana. No entanto, a rugosidade foi considerada maior nos prolongamentos citoplasmáticos do que ao redor do núcleo, em ambos os tempos de vida dos camundongos avaliados (LEE et al., 2015). Além disso, os autores avaliaram a expressão de VCAM-1 e da proteína citoesquelética vinculina, através da intensidade de imunofluorescência, sendo observada uma alta expressão dessas moléculas nos dois períodos de patogênese da AR. Os autores sugeriram então que alterações morfológicas no citoesqueleto ocorrem em FLS acometidos pela AR e que o aumento da rugosidade está relacionado com a progressão e gravidade da AR, podendo ocorrer em decorrência da degradação tecidual (LEE et al., 2015).

Além disso, tem-se sugerido a medida da rigidez celular através da nanoindentação por MFA como um marcador para determinar o desenvolvimento de determinada doença (ZHOU et al., 2017). Como exemplo, o estado de um carcinoma e do seu potencial desenvolvimento metastático podem ser determinados através do módulo elástico e assim direcionar intervenções terapêuticas (ZHOU et al., 2017). A nanoindentação oferece medidas mais diretas e confiáveis de propriedades mecânicas. Essas propriedades são governadas, principalmente, pela rede formada por filamentos de actina do citoesqueleto podendo refletir nas medidas do módulo elástico celular (FLETCHER; MULLINS, 2010).

Zhou e colaboradores (2017) mediram a correlação da rigidez celular com o rearranjo de filamentos de F-actina em células metastáticas do carcinoma de ovário Hey A8 HM (isoladas do abdômen de camundongo) e células NM (isoladas do carcinoma de ovário de camundongo). Os resultados indicaram um módulo elástico maior nas extremidades das células Hey A8 HM do que em seu interior, enquanto para células NM não houve diferença no módulo elástico medido nas extremidades e no seu interior. As células NM apresentaram um módulo elástico em seu interior estatisticamente maior que o módulo elástico interior das células Hey A8 HM o que leva a conclusão de que o perfil de rigidez intracelular é intrinsecamente diferente nas duas células (ZHOU et al., 2017). Esses resultados podem ocorrer devido a diferença na rede de actina do citoesqueleto nos dois tipos celulares (ZHOU et al., 2017). Consistente com isso, os autores observaram

através de imunofluorescência que os filamentos de F-actina das células Hey A8 HM é altamente desigual e mais alinhado em comparação aos filamentos das células NM, que se mostrou mais aleatório, o que pode impactar no perfil de rigidez celular e nas alterações do módulo elástico (ZHOU et al., 2017).

Outros estudos também utilizam essa metodologia para avaliar a citotoxicidade de compostos. Pastrana e colaboradores (2019) observaram que a exposição de fibroblastos NIH3T3 a nanotubos de carbono (CBNs) por 2h levou a uma redução no módulo elástico e que, após 24h de exposição, essa redução se tornou considerável, indicando que a toxicidade provocada por CBNs altera parâmetros físicos celulares como o tamanho e a rigidez celular. Os autores ainda observaram através de imunofluorescência que a citotoxicidade de CBNs altera fibras de F-actina, levando a ruptura do citoesqueleto, o que, consequentemente, impactou na adesão e migração celular (PASTRANA et al., 2019). A adesão e a migração celular podem ser impactadas pelo estresse provocado no microambiente por diferentes tipos ou estágios de doenças, manifestando-se de diferentes maneiras a depender do tipo celular afetado e da patogenia que altera as propriedades biomecânicas da célula (MIERKE, 2020).

A espectroscopia Raman foi realizada a fim de se determinar a diferença espectral entre HFLS infectados pelo CHIKV e não infectados e assim se obter o perfil bioquímico dessas células. As diferenças na intensidade dos espectros refletem as variações nos picos em HFLS infectados por CHIKV, sendo correspondentes a diferentes biomoléculas (**Figura 14A**). Através da análise de PCA foi possível realizar a interpretação dos dados espectrais e a diferenciação dos dois grupos experimentais, identificando alterações bioquímicas nas células infectadas pelo CHIKV (**Figura 14B e 15A**). Além disso, as correlações positivas e negativas encontradas entre os PCs demonstram a diferença de intensidade nos sinais de espectro Raman confirmando que, de fato, a infecção de HFLS pelo CHIKV altera componentes bioquímicos celulares (**Figura 14C**).

Dentre as alterações mais significativas observadas, a diferença encontrada em PC2 nos picos 1031, 1223 e 1635 cm^{-1} em HFLS infectados pelo CHIKV correspondem a conteúdos de colágeno (**Figura 15B e Tabela 3**). O colágeno compõe uma família de glicoproteínas caracterizadas por duas regiões não helicoidais em cada extremidade da hélice e uma região helicoidal tripla, sendo esta última o elemento estrutural definidor de todos os colágenos. É formado por uma repetição de aminoácidos $[\text{Gly} - \text{X} - \text{Y}]_n$, onde as posições X e Y podem ser substituídas pela Prolina ou pela Hidroxiprolina,

respectivamente (SORUSHANOVA et al., 2019). Até o momento, existem 29 tipos de colágeno, onde os tipos I a IV são os mais abundantes no corpo humano, sendo as suas principais funções as de conexão entre os tecidos e manutenção da estrutura e integridade de órgãos (GELSE, 2003; SORUSHANOVA et al., 2019).

A síntese do colágeno pode ser realizada por diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos e condrócitos, e se inicia de maneira intracelular, ocorrendo a transcrição do mRNA de genes de cadeia α . A cadeia α entra no lúmen do RE com o terminal N como pré-pró-colágeno que depois é convertido em pró-colágeno através da remoção do peptídeo sinal. A síntese começa pela cadeia N-terminal permite que as pró-cadeias α permaneçam desenroladas por tempo necessário para que a tradução seja completa e então, três pró-cadeias possam se alinhar precisamente na região C-terminal antes de iniciar a formação da tripla-hélice (SORUSHANOVA et al., 2019). Ainda no RE, modificações pós-tradução (PTM - *Post-Translational Modifications*) como hidroxilação e glicosilação podem ocorrer, contribuindo assim para a estabilidade térmica e mecânica do colágeno na forma tripla helicoidal e na forma de agregados de fibrilas, respectivamente (SORUSHANOVA et al., 2019). Uma vez que a tripla-hélice está pronta e completamente dobrada, o trímero de pró-colágeno é empacotado dentro do complexo de Golgi em vesículas secretoras que são liberadas para o espaço extracelular, onde este é processado proteoliticamente através da remoção enzimática dos terminais N e C, resultando em um trímero de colágeno capaz de formar agregados em grandes fibrilas (GELSE, 2003; SORUSHANOVA et al., 2019).

Terentis e colaboradores (2013) compararam através de espectroscopia Raman as alterações bioquímicas em células BJ (fibroblastos de pele humana) e células Sk-Mel-2 (metastáticas de melanoma). As análises de PCA indicaram alterações nos picos vibracionais próximos a 857, 940 e 1461 cm^{-1} para células Sk-Mel-2, características espectrais atribuídas a colágenos, associadas aos modos vibracionais de prolina e do esqueleto proteico. Já para células BJ, a análise de PCA indicou um espectro muito mais uniforme e compacto, com picos vibracionais de colágeno próximos a 935 cm^{-1} . As análises indicaram uma maior presença de conteúdos de colágeno, com picos vibracionais apresentando correlação positiva no citoplasma de células Sk-Mel-2 quando comparadas a células BJ, sugerindo a alta produção dessa glicoproteína em células metastáticas de melanoma (TERENTIS et al., 2013). Diferente do observado no presente estudo, os picos correspondentes a espectros vibracionais de colágeno 1031 e 1042 cm^{-1} apresentaram

uma correlação negativa na análise de PCA dos grupos celulares experimentais, indicando uma diminuição no conteúdo de colágeno (**Figura 14C**). Consistente com isso, a diferença espectral realizada com base em PC2 (**Figura 15B**) indicou a mesma alteração no pico 1031 cm^{-1} , além de indicar alterações nos picos 1223 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} também correspondentes a modos vibracionais de colágeno, inferindo-se que a infecção pelo CHIKV altera o conteúdo de colágeno.

A análise de expressão gênica indicou um aumento na expressão de *MMP1* (**Figura 17**). *MMP1* é o gene responsável por codificar a peptidase M10, enzima membro da família de MMPs com ligação ao zinco, e que é responsável por manter a homeostase de órgãos e tecidos (MALEMUD, 2019; QUINTERO-FABIÁN et al., 2019), ao passo que também pode estar envolvida em processos patológicos como a AR e a osteoartrite (MALEMUD, 2019). As metaloproteinases são responsáveis por clivar colágeno em fragmentos menores que podem ser internalizados pelas células. Fibroblastos são, na sua maioria, responsáveis por manter a homeostase da MEC, esperando-se então que sintetizem ativamente o colágeno (TERENTIS et al., 2013). Em fibroblastos de pulmão humano (células WI-26) tratados com rapamicina, Poulalhon e colaboradores (2006) observaram através de qPCR o aumento da expressão de *MMP1* de forma dose-dependente, ao passo que a expressão dos genes *COL1A1* (colágeno tipo I, $\alpha 1$), *COL1A2* (colágeno tipo I, $\alpha 2$) e *COL3A1* (colágeno tipo III, $\alpha 1$) foi diminuída também de forma dose-dependente. Análises de Western blot confirmaram a redução da expressão da proteína colágeno tipo I e imunoenaios confirmaram o aumento de expressão da proteína *MMP1* (POULALHON et al., 2006).

Em células primárias de condrócitos humanos (HC) infectadas pelo vírus Mayaro (MAYV), pertencente a mesma família e gênero do CHIKV, foi analisada por qPCR a expressão de diferentes genes responsáveis por interações célula-célula e célula-MEC, dentre eles a expressão de *MMP1* e genes responsáveis pela síntese de colágeno como *COL16A1*, *COL1A1*, *COL4A2*, *COL5A1*, *COL6A1* e *COL6A2*. Como esperado, o aumento de expressão de *MMP1* foi acompanhado da redução de expressão dos genes responsáveis pela síntese de colágeno, corroborando com o papel crítico das metaloproteinases na destruição da cartilagem e degradação óssea em infecções por alfavírus (BENGUE et al., 2019).

Outro gene que teve sua expressão aumentada foi o gene *VEGFA* (**Figura 17**), membro da família de fatores de crescimento, induzindo a proliferação e a migração

vascular endotelial, como ocorre na angiogênese (ZHAO et al., 2016). A neovascularização é o processo de desenvolvimento de novos vasos a partir de uma estrutura microvascular já existente. Esse processo envolve divisão celular endotelial, degradação seletiva de membranas vasculares basais, alterações na MEC e na migração endotelial (KOCH, 2000; KOCH; DISTLER, 2007). Em ratos, Brahn e colaboradores (2008) induziram a artrite injetando colágeno tipo II (CIA – *Collagen-Induced Arthritis*) e avaliaram a expressão gênica de *VEGF* antes e após o tratamento com 2ME2 (2-Methoxyestradiol). Os autores observaram uma elevada expressão de *VEGF* nos ratos não tratados, com uma alta indução de angiogênese. Após o tratamento com 2ME2, ocorre uma redução de 47% na expressão de *VEGF* e, consequentemente, uma redução da angiogênese (BRAHN et al., 2008). Em um outro estudo, Zhao e colaboradores (2016), observaram os efeitos do tratamento com VEGF-D em fibroblastos cardíacos. Além de induzir o processo de migração de fibroblastos, o tratamento com VEGF-D aumentou a síntese de colágeno tipo I de maneira dose-dependente assim como aumentou a secreção de metaloproteinases MMP2 e MMP9 no meio de cultivo (ZHAO et al., 2016).

Kopeć e Abramczyk (2018) observaram o espectro Raman de uma pequena artéria ao redor de um tumor de câncer de mama, fornecendo sangue para o tecido. Imagens de MFA, Raman e cortes histológicos indicaram a presença de fibras de colágeno e de fibroblastos ao redor da artéria, compondo a massa tumoral, indicando que células tumorais invadem a matriz extracelular composta de colágeno ao redor de fibroblastos. Os espectros Raman indicaram alterações em picos de colágeno (855 e 874 cm^{-1}) e no modo de alongamento C-C no anel de Prolina (937 cm^{-1}), aminoácido que pode estar presente na composição de colágeno. Segundo os autores, a presença de fibroblastos e a síntese de colágeno parece ser essencial para o equilíbrio e rigidez da massa tumoral, favorecendo o crescimento de uma estrutura vascular estável para fornecer nutrientes (KOPEĆ; ABRAMCZYK, 2018). Esses resultados em tecidos com intensa vascularização podem sugerir que o aumento de expressão de *VEGFA*, além de induzir o processo de angiogênese, pode levar a alterações no conteúdo de colágeno.

Neste estudo, foi verificado um aumento na expressão do gene *UGDH* (UDP-Glucose 6-Dehydrogenase) em HFLS após a infecção pelo CHIKV (**Figura 17**). Esse gene é responsável por codificar a proteína que catalisa a conversão da UDP-glicose em UDP-glicuronato, participando na síntese de proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs) como ácido hialurônico, sulfato de heparan e sulfato de condroitina (CLARKIN

et al., 2011; EGGER et al., 2010, 2011; PRYDZ; DALEN, 2000). Amostras de cartilagem humana obtidas do joelho de pacientes com osteoartrite (OA) foram submetidas ao isolamento de condrócitos. Os condrócitos foram então submetidos ao tratamento com RNA de interferência (siRNA) específico para *UGDH*. Análises por qPCR e Western blot revelaram uma diminuição na expressão o mRNA de *UGDH*, assim como na expressão da proteína. A coloração dos condrócitos por *Alcian blue* indicou uma supressão na síntese de PGs. Em paralelo, o tratamento de condrócitos com IL- β inibiu a expressão da proteína *UGDH* e, conseqüentemente, diminuiu a concentração de GAGs no sobrenadante de cultivo. Sendo assim, os autores concluíram que na OA, a baixa expressão de *UGDH* tem um papel crítico na diminuição da produção de PGs e GAGs, podendo levar a subsequente perda da matriz cartilaginosa e desorganização da cartilagem articular (WEN et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, a massa tumoral de um câncer de mama foi identificada sendo composta por intensa vascularização e fibroblastos sintetizando colágeno (KOPEĆ; ABRAMCZYK, 2018). O espectro Raman identificou alterações nos picos de glicogênio (840 cm^{-1}), glicose (1125 cm^{-1}) e ácido láctico (917 cm^{-1}) na massa tumoral, indicando a distribuição de conteúdo de carboidratos de matriz intracelular e a conseqüente alteração no metabolismo de células cancerígenas (KOPEĆ; ABRAMCZYK, 2018). Esse conteúdo consiste, principalmente, de GAGs sintetizados por fibroblastos no tecido conjuntivo frouxo e as suas vibrações no espectro Raman são parcialmente sobrepostas pelas vibrações de glicogênio e ácido láctico (KOPEĆ; ABRAMCZYK, 2018).

Sabe-se que *UGDH* tem papel fundamental na via glicolítica, uma vez que um carbono da glicose é convertido em UDP-glicose e a enzima *UGDH* catalisa a reação, convertendo UDP-glicose em UDP-glicuronato, sendo este último utilizado para a síntese de GAGs, incluindo o ácido hialurônico (ARNOLD et al., 2020). Esses processos foram observados em células mesenquimais de câncer de mama, sugerindo que no tumor, as células mesenquimais aumentam a produção de UDP-glicuronato e, conseqüentemente, a síntese de ácido hialurônico. Além disso, foi observado que a reprogramação metabólica em células mesenquimais tumorais aumenta o fluxo glicolítico em ácido hialurônico através de amino açúcares e nucleotídeo de açúcar, forma ativa de monossacarídeos (ARNOLD et al., 2020). O elevado catabolismo de glicose produz um excesso de

piruvato, produto final glicolítico, que é convertido em lactato ou em Acetil-CoA que, por sua vez, é usado na síntese de ácidos graxos (KOPEĆ; ABRAMCZYK, 2018).

Por meio da espectroscopia Raman de HFLS infectados pelo CHIKV também foram observadas alterações na composição lipídica dos fibroblastos. Uma correlação negativa foi encontrada no pico 981 cm^{-1} , indicando uma diminuição no conteúdo de lipídeos (**Figura 14C** e **Tabela 3**). Além disso, a diferença espectral entre HFLS não infectados e infectados pelo CHIKV, confirmou a alteração nesse pico e indicou uma alteração também nos picos 1444 e 1660 cm^{-1} (**Figura 15B** e **Tabela 3**), picos com assinaturas espectrais relacionadas a conteúdos de lipídeos. Terentis e colaboradores (2013) compararam células de um melanoma (Sk-Mel-2) com células normais da pele (células BJ). Em células Sk-Mel-2, o espectro Raman indicou alterações nos picos vibracionais 1301 , 1439 , 1657 e 1669 cm^{-1} , todos eles correlacionados a conteúdo lipídico. Quando comparados aos espectros de células BJ, estas apresentaram espectros de conteúdo de lipídeos próximos aos picos 718 , 1296 , 1438 e 1657 cm^{-1} , com um sinal de intensidade menor do que aquele observado em células Sk-Mel-2. Os autores correlacionam a maior incidência de corpos lipídicos em células metastáticas com a maior taxa de divisão celular e crescimento, quando comparadas as células fibroblásticas normais, necessitando assim de uma maior renovação da membrana lipídica e de transporte lipídico através do citoplasma (TERENTIS et al., 2013).

Utilizando o mesmo tipo celular (células BJ), Eberhardt e colaboradores (2018) compararam a diferença espectral por Raman e espectroscopia FT-IR nessas células em estado quiescente induzido, senescência e em estado proliferativo recuperado da quiescência. Células BJ quiescentes com contato celular inibido apresentaram picos próximos a 1240 , 1740 e 2800 cm^{-1} associados ao conteúdo lipídico quando comparadas as células em estado proliferativo. No estado de senescência, um aumento no pico 1740 cm^{-1} também foi observado. Ambas as espectroscopias conseguiram diferenciar a composição bioquímica em três estados diferentes de uma mesma célula (EBERHARDT et al., 2018).

Tsikritsis e colaboradores (2016), compararam os espectros Raman de fibroblastos humanos 1BR3 de pele e fibroblastos de uma paciente de 20 anos com a doença de Huntington. Os resultados mostraram uma assinatura molecular de fibroblastos saudáveis *versus* fibroblastos acometidos pela doença. A análise de PCA, então, revelou que os picos 608 , 702 , 717 - 719 , 957 - 960 , 1296 , 1302 , 1437 - 1451 , 1440 - 1444 , 1659 - 1674

cm^{-1} eram correspondentes a conteúdos lipídicos e de colesterol nos fibroblastos 1BR3, picos estes não encontrados nos fibroblastos acometidos pela doença de Huntington, podendo-se inferir que um menor conteúdo lipídico é encontrado em fibroblastos acometidos por esta doença autoimune (TSIKRITSIS; ELFICK; DOWNES, 2016).

A AR, também uma doença autoimune, pode ser caracterizada por modificações no perfil lipídico, levando assim ao risco de alterações cardiovasculares em decorrência de processos inflamatórios (AUDO et al., 2018). Análises do fluído sinovial e do soro de pacientes com AR identificaram um alto nível de FABP4 (*Fatty Acid Binding Protein-4*) quando comparado com pacientes com OA. Associados a isso, um alto nível de colesterol total tanto no fluido sinovial como no soro, foi observado em pacientes com AR. Análises de imuno-histoquímica confirmaram a alta expressão de FABP4 no tecido sinovial de pacientes com AR (ANDRÉS CEREZO et al., 2013). FABP4 é membro da família de proteínas citoplasmáticas ligantes a ácidos graxos e foi descrita provocando a resistência à insulina e a problemas cardiovasculares, influenciando tanto em vias inflamatórias como metabólicas (ANDRÉS CEREZO et al., 2013).

Alatibi e colaboradores (2021) evidenciaram alterações em fibroblastos obtidos de pacientes a desordem lc-FAOD (*Long-chain fatty acid oxidation disorders*). A análise lipidômica por espectroscopia de massa indicou uma acentuada diferença no perfil de fosfolipídeos, caracterizada por alterações na degradação de ácidos graxos, assim como uma alteração sistêmica na sua composição. Uma menor distribuição de fosfatidiletanolamina foi identificada, enquanto um maior conteúdo de fosfatidilcolina foi encontrado. Além disso, uma diminuição em esfingomielinas e um aumento de ceramidas, cardiolipina e hexosilceramidas foi observado. Também foi observado um maior conteúdo bioativo de lisofosfolipídeos pro-inflamatórios, algo já esperado pelos autores, uma vez que fibroblastos de lc-FAOD podem apresentar um notável acúmulo de lipídeos (ALATIBI et al., 2021). A abordagem lipidômica realizada nesse estudo amplia a compreensão da patogênese da doença, o que pode ser facilmente aplicável a compreensão de outros processos patológicos como a infecção pelo CHIKV e a decorrente poliartralgia apresentada.

Além disso, alterações no conteúdo proteico podem ser observadas através dos espectros Raman obtidos (**Figura 14C, 15B e Tabela 3**) com destaque para os picos 981, 1223, 1242, 1660 e 1667 cm^{-1} correspondentes aos picos de amidas I e III e folhas- β . Tsikritsis e colaboradores (2016) observaram um maior conteúdo de folhas- β em

fibroblastos acometidos por doença de Huntington quando comparados a fibroblastos saudáveis (TSIKRITSIS; ELFICK; DOWNES, 2016). Consistente com esses dados, Terentis e colaboradores (2013) observaram um maior conteúdo de amida III em células Sk-Mel-2, correspondentes aos picos próximos a 1260 cm^{-1} . Além disso, os autores também encontraram um maior conteúdo de amida I correspondente ao pico 1658 cm^{-1} quando comparados as células BJ (TERENTIS et al., 2013).

Por fim, o presente estudo observou um aumento de IP-10 e uma redução de MCP-1 após a infecção viral, enquanto, RANTES e IL-8 não apresentaram diferença significativa (**Figura 18**). Os resultados obtidos diferem dos estudos realizados por Phuklia e colaboradores (2013) e Sukkaew e colaboradores (2018) que, utilizando o mesmo tipo celular e a metodologia de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), após 48h de infecção pelo CHIKV em MOI 0,001, observaram um aumento expressivo de MCP1 e IL-8 (PHUKLIA et al., 2013; SUKKAEW et al., 2018). Vale destacar que a MOI utilizada nestes estudos foi muito menor a utilizada no presente estudo.

Em outros estudos realizados, utilizando o soro de pacientes infectados pelo CHIKV e detectando quimiocinas através da metodologia de CBA, também foi possível observar resultados divergentes. Tanabe e colaboradores (2019) observaram o aumento de MCP-1, IL8, RANTES, IP-10 e MIG no soro de pacientes em fase aguda (≤ 7 dias) quando comparados a doadores saudáveis (TANABE et al., 2019); enquanto Jacob-Nascimento e colaboradores (2021), detectaram diminuição de MIG também em pacientes em fase aguda (≤ 7 dias) quando comparados a doadores saudáveis (JACOB-NASCIMENTO et al., 2021).

Em nosso estudo, também foi verificado um aumento de IP-10 no sobrenadante dos HFLS 48h após infecção quando comparado ao sobrenadante do controle celular. A quimiocina IP-10 (proteína induzida por interferon γ 10 kDa) é uma molécula que, através da ligação ao receptor CXCR3+, é capaz de induzir apoptose, regular o crescimento e proliferação celular, assim como induzir angiogênese em doenças infecciosas e inflamatórias (LIU et al., 2011). MCP-1, por sua vez, é membro da família C-C, e é capaz de regular a migração e infiltração de monócitos, linfócitos T de memória e células NK (*Natural Killers*) (DESHMANE et al., 2009). Além disso, a produção exacerbada dessa quimiocina tem sido estudada em diferentes células no contexto de doenças infecciosas, como a CHIKF (RUIZ SILVA et al., 2016), e doenças autoimunes, como a AR (HAYASHIDA et al., 2001).

Os resultados aqui apresentados mostram perspectivas promissoras sobre os mecanismos de interação entre o vírus CHIKV e o hospedeiro no contexto do microambiente sinovial. As alterações em propriedades biomecânicas e na estrutura do citoesqueleto podem auxiliar na compreensão dos danos e alterações celulares decorrentes desta infecção viral. Além disso, a modulação das biomoléculas estudadas contribui com a elucidação do mecanismo fisiopatológico envolvido na interação vírus-HFLS. Esses achados ainda não foram reportados na literatura colaborando para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta arbovirose.

9. CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que:

- Os HFLS são infectados pelo CHIKV *in vitro*, sendo a infecção confirmada por diferentes metodologias;
- A infecção pelo CHIKV leva a alterações biomecânicas celulares, como o processo de rigidez celular, corroborando com resultados que demonstram alterações em filamentos de actina e ruptura no citoesqueleto;
- Os HFLS apresentam alterações na composição bioquímica, sendo observadas alterações em moléculas como colágeno, lipídeos, folhas- β , amidas I e III;
- A infecção leva ao aumento da expressão dos genes *MMP1*, *VEGFA* e *UGDH*, podendo estar associada ao dano na matriz extracelular, angiogênese e na homeostase da sinóvia;
- Por fim, a infecção pelo CHIKV leva a alterações na secreção das quimiocinas IP10 e MCP-1 no meio de cultivo;

O presente trabalho auxilia no entendimento sobre as interações vírus-hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a infecção pelo CHIKV.

REFERÊNCIAS

- ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 4, p. 433–459, jul. 2010.
- ABRAMCZYK, H.; KOPEC, M. Applications of Raman scattering in biomedicine , telecommunication and thermometry. **Measurement Automation Monitoring**, v. 63, n. 02, p. 38–40, 2017.
- ACHARYA, D. et al. Loss of Glycosaminoglycan Receptor Binding after Mosquito Cell Passage Reduces Chikungunya Virus Infectivity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004139, 20 out. 2015.
- AEBI, U. et al. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. **Nature**, v. 323, n. 6088, p. 560–564, out. 1986.
- AGRAWAL, M. et al. Chikungunya virus modulates the miRNA expression patterns in human synovial fibroblasts. **Journal of Medical Virology**, p. 1–10, 2019.
- ALATIBI, K. I. et al. Different Lipid Signature in Fibroblasts of Long-Chain Fatty Acid Oxidation Disorders. **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1239, 18 maio 2021.
- ANDRÉS CERREZO, L. et al. The level of fatty acid-binding protein 4, a novel adipokine, is increased in rheumatoid arthritis and correlates with serum cholesterol levels. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 441–447, out. 2013.
- ARNAOUT, M. A.; GOODMAN, S. L.; XIONG, J.-P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 495–507, out. 2007.
- ARNOLD, J. M. et al. UDP-glucose 6-dehydrogenase regulates hyaluronic acid production and promotes breast cancer progression. **Oncogene**, v. 39, n. 15, p. 3089–3101, 9 abr. 2020.
- AUDO, R. et al. PhosphoLipid transfer protein (PLTP) exerts a direct pro-inflammatory effect on rheumatoid arthritis (RA) fibroblasts-like-synoviocytes (FLS) independently of its lipid transfer activity. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0193815, 22 mar. 2018.
- BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. **Journal of Visualized Experiments**, n. 93, p. 1–10, 2014.
- BAKRY, R. M. et al. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGFA)-1154 G/A gene polymorphism (rs1570360) in rheumatoid arthritis patients. **The Egyptian Rheumatologist**, v. 44, n. 3, p. 197–201, jun. 2022.
- BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 233, n. 1, p. 233–255, jan. 2010.
- BASORE, K. et al. Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1725–1737.e16, jun. 2019.
- BENGUE, M. et al. Mayaro Virus Infects Human Chondrocytes and Induces the Expression of Arthritis-Related Genes Associated with Joint Degradation. **Viruses**, v.

11, n. 9, p. 797, 29 ago. 2019.

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. **Atomic Force Microscope**. [s.l: s.n.]. v. 56

BLANCHONIN, L. et al. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 235–263, jan. 2014.

BOTELHO, R. M. et al. Biomechanical and functional properties of trophoblast cells exposed to Group B Streptococcus in vitro and the beneficial effects of uvaol treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1863, n. 9, p. 1417–1428, set. 2019.

BOTTINI, N.; FIRESTEIN, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 1, p. 24–33, 2013.

BRAHN, E. et al. An Angiogenesis Inhibitor, 2-Methoxyestradiol, Involutes Rat Collagen-Induced Arthritis and Suppresses Gene Expression of Synovial Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 11, p. 2119–2128, nov. 2008.

BURNHAM, N. A. et al. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2003.

BUSTAMANTE, M. F. et al. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2017.

BUTLER, H. J. et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. **Nature Protocols**, v. 11, n. 4, p. 664–687, 10 abr. 2016.

BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface Science Reports**, v. 59, n. 1–6, p. 1–152, out. 2005.

CAMPOS, A. P. R. et al. Depression and quality of life in rheumatoid arthritis individuals and stable health individuals: a comparative study. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 20, n. 4, p. 401–407, 2013.

CHANG, S. K. et al. Cadherin-11 regulates fibroblast inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 20, p. 8402–8407, 17 maio 2011.

CHOI, S. et al. Medical Applications of Atomic Force Microscopy and Raman Spectroscopy. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 71–97, 2014.

CHOW, A. et al. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 15 jan. 2011.

CLARKIN, C. E. et al. Regulation of UDP-glucose dehydrogenase is sufficient to modulate hyaluronan production and release, control sulfated GAG synthesis, and promote chondrogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 3, p. 749–761, mar. 2011.

- CODAN, B. et al. Exploring the elasticity and adhesion behavior of cardiac fibroblasts by atomic force microscopy indentation. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014.
- CONSTANT, L. E. C. et al. Overview on Chikungunya Virus Infection: From Epidemiology to State-of-the-Art Experimental Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. October, p. 1–20, 5 out. 2021.
- COUTURIER, E. et al. Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study. **Rheumatology**, v. 51, n. 7, p. 1315–1322, 1 jul. 2012.
- CRISP, M. et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. **Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 1, p. 41–53, 2 jan. 2006.
- CROSS, S. E. et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 780–783, 2 dez. 2007.
- DAHL, K. N.; RIBEIRO, A. J. S.; LAMMERDING, J. Nuclear Shape, Mechanics, and Mechanotransduction. **Circulation Research**, v. 102, n. 11, p. 1307–1318, 6 jun. 2008.
- DAI, C. et al. VEGF-C Gene Polymorphisms Increase Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. **International Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1397–1403, 2019.
- DARLING, E. M. et al. A Thin-Layer Model for Viscoelastic, Stress-Relaxation Testing of Cells Using Atomic Force Microscopy: Do Cell Properties Reflect Metastatic Potential? **Biophysical Journal**, v. 92, n. 5, p. 1784–1791, mar. 2007.
- DE CALUWÉ, L. et al. The CD147 Protein Complex Is Involved in Entry of Chikungunya Virus and Related Alphaviruses in Human Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. February, 25 fev. 2021.
- DESHMANE, S. L. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, jun. 2009.
- DEVREOTES, P.; HORWITZ, A. R. Signaling Networks that Regulate Cell Migration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 8, p. a005959, 3 ago. 2015.
- DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. **Science**, v. 324, n. 5935, p. 1673–1677, 26 jun. 2009.
- DRESSELHAUS, M. S. et al. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. **Physics Reports**, v. 409, n. 2, p. 47–99, mar. 2005.
- DUFRENE, Y. F.; PELLING, A. E. Force nanoscopy of cell mechanics and cell adhesion. **Nanoscale**, v. 5, n. 10, p. 4094, 2013.
- EA, H.; BAZILLE, C.; LIOTÉ, F. Histología y fisiología de la membrana sinovial. **Elsevier**, v. 14, n. 021, p. 1–6, 2008.
- EBERHARDT, K. et al. Raman and infrared spectroscopy reveal that proliferating and quiescent human fibroblast cells age by biochemically similar but not identical processes. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0207380, 3 dez. 2018.

EDWARDS, J. C. W. Synovial intimal fibroblasts. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 54, p. 395–397, 1995.

EGGER, S. et al. UDP-glucose dehydrogenase: structure and function of a potential drug target. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. 5, p. 1378–1385, 1 out. 2010.

EGGER, S. et al. Structure and Mechanism of Human UDP-glucose 6-Dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 23877–23887, jul. 2011.

EGGERT, U. S.; MITCHISON, T. J.; FIELD, C. M. Animal Cytokinesis: From Parts List to Mechanisms. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 543–566, 1 jun. 2006.

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, jun. 2015.

EL-KIRAT-CHATEL, S.; DUFRÊNE, Y. F. Nanoscale Imaging of the Candida – Macrophage Interaction Using Correlated Fluorescence-Atomic Force Microscopy. **ACS Nano**, v. 6, n. 12, p. 10792–10799, 21 dez. 2012.

ETIENNE-MANNEVILLE, S. Microtubules in Cell Migration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, n. 1, p. 471–499, 6 out. 2013.

FIRTH, A. E. et al. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. v. 19, p. 1–19, 2008.

FISCHER, T.; HAYN, A.; MIERKE, C. T. Effect of Nuclear Stiffness on Cell Mechanics and Migration of Human Breast Cancer Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. May, p. 1–18, 29 maio 2020.

FLETCHER, D. A.; MULLINS, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 485–492, 27 jan. 2010.

FOISNER, R.; GERACE, L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. **Cell**, v. 73, n. 7, p. 1267–1279, jul. 1993.

FRANCO, D. et al. Raman spectroscopy differentiates between sensitive and resistant multiple myeloma cell lines. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 187, p. 15–22, dez. 2017.

FROLOVA, E. I. et al. Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11679–11695, 15 nov. 2010.

GALBRAITH, C. G.; SHEETZ, M. P. Forces on adhesive contacts affect cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 566–571, out. 1998.

GARCIA, P. D.; GUERRERO, C. R.; GARCIA, R. Nanorheology of living cells measured by AFM-based force-distance curves. **Nanoscale**, v. 12, n. 16, p. 9133–9143, 2020.

GARDEL, M. L. et al. Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, n. 1, p. 315–

333, 10 nov. 2010.

GASQUE, P. et al. Chikungunya Pathogenesis: From the Clinics to the Bench. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S446–S448, 15 dez. 2016.

GELSE, K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531–1546, 28 nov. 2003.

GOLAN, M. et al. AFM Monitoring the Influence of Selected Cryoprotectants on Regeneration of Cryopreserved Cells Mechanical Properties. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–10, 29 jun. 2018.

GRUENBAUM, Y.; AEBI, U. Intermediate filaments: a dynamic network that controls cell mechanics. **F1000Prime Reports**, v. 6, n. July, p. 1–7, 8 jul. 2014.

GUCK, J. et al. Critical review: cellular mechanobiology and amoeboid migration. **Integrative Biology**, v. 2, n. 11–12, p. 575–583, 2 nov. 2010.

HASSANTOUFIGHI, A.; WARD, I.; HIGGS, J. Ultrasonographic Evidence of Persistent Synovitis in a Chikungunya-Infected Service Member. **Military Medicine**, v. 182, n. 11, p. e2108–e2111, 2017.

HAYASHIDA, K. et al. Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. **Arthritis Research & Therapy**, v. 3, n. 2, p. 118, 5 jan. 2001.

HERTZ, H. Über die Berührung fester elastischer Körper. **Journal für die reine und angewandte Mathematik**, v. 171, p. 156–171, 1881.

HOARAU, J. et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 5914–5927, 2010.

HORCAS, I. et al. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Review of Scientific Instruments**, v. 78, n. 1, 2007.

HU, X. et al. RGS1 silencing inhibits the inflammatory response and angiogenesis in rheumatoid arthritis rats through the inactivation of Toll-like receptor signaling pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, p. 20432–20442, 22 nov. 2019.

HUANG, H.; KAMM, R. D.; LEE, R. T. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 1, p. C1–C11, jul. 2004.

HUANG, S.; INGBER, D. E. The structural and mechanical complexity of cell-growth control review. **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 131–138, 1999.

HUSSAIN, K. M. et al. Establishment of a Novel Primary Human Skeletal Myoblast Cellular Model for Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21406, 19 ago. 2016.

IZQUIERDO, E. et al. Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: Clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 9, p. 2575–2583, 2011.

JACOB-NASCIMENTO, L. C. et al. Acute-Phase Levels of CXCL8 as Risk Factor for Chronic Arthralgia Following Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. October, p. 1–10, 1 out. 2021.

JAVELLE, E. et al. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003603, 11 mar. 2015.

JAY, G. D.; WALLER, K. A. The biology of Lubricin: Near frictionless joint motion. **Elsevier - Matrix Biology**, v. 39, p. 17–24, 2014.

KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 1 dez. 2002.

KIM, K. S. et al. AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30066, 17 jan. 2012.

KOCH, A. E. The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 54, n. 6, p. 855–865, 2000.

KOCH, A. E.; DISTLER, O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. Suppl 2, p. S3, 2007.

KOPEĆ, M.; ABRAMCZYK, H. Angiogenesis - a crucial step in breast cancer growth, progression and dissemination by Raman imaging. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 198, p. 338–345, jun. 2018.

LANGE, J. R.; FABRY, B. Cell and tissue mechanics in cell migration. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 16, p. 2418–2423, out. 2013.

LEE, J.-W. et al. Detecting changes in arthritic fibroblast-like synoviocytes using atomic force microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, n. 11, p. 982–988, nov. 2015.

LEFÈVRE, S. et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. **Nature Medicine**, v. 15, n. 12, p. 1414–1420, 2009.

LENTSCHER, A. J. et al. Chikungunya virus replication in skeletal muscle cells is required for disease development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1466–1478, 10 fev. 2020.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, fev. 2014.

LI, Q. S. et al. AFM indentation study of breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 4, p. 609–613, out. 2008.

LI, Z. et al. Identification of biomarkers associated with synovitis in rheumatoid arthritis by bioinformatics analyses. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 9, p. 1–11, 2020.

LIU, B. et al. Increased Substrate Stiffness Elicits a Myofibroblastic Phenotype in Human Lamina Cribrosa Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 59,

n. 2, p. 803, 1 fev. 2018.

LIU, J. et al. Atomic Force Mechanobiology of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37559, 18 maio 2012.

LIU, M. et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 3, p. 121–130, jul. 2011.

LOHACHANAKUL, J. et al. High concentrations of circulating interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 with low concentrations of interleukin-8 were associated with severe chikungunya fever during the 2009-2010 outbreak in Thailand. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 2, p. 134–138, fev. 2012.

LOUISE, C.; ETIENNE, D.; MARIE-PIERRE, R. AFM sensing cortical actin cytoskeleton destabilization during plasma membrane electroporation. **Cytoskeleton**, v. 71, n. 10, p. 587–594, out. 2014.

LUMSDEN, W. H. R. AN EPIDEMIC OF VIRUS DISEASE IN SOUTHERN PROVINCE, TANGANYIKA TERRITORY, IN 1952-53. v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.

LUO, Q. et al. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 9, p. 1953–1960, set. 2016.

MALEMUD, C. J. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS. **Biochemical Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 33–40, jul. 2019.

MAMMOTO, T.; INGBER, D. E. Mechanical control of tissue and organ development. **Development**, v. 137, n. 9, p. 1407–1420, 1 maio 2010.

MIERKE, C. T. Editorial: Biomechanical Properties of Cells and Tissues and Their Impact on Cellular Adhesion and Motility. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. June, p. 1–2, 17 jun. 2020.

MIHAI, C. et al. PTEN inhibition improves wound healing in lung epithelia through changes in cellular mechanics that enhance migration. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 3, p. L287–L299, 1 fev. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50, 2017. v. 48, n. Tabela 2, p. 1–13, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 42 de 2022**. [s.l.: s.n.]. v. 53

MIROSHNIKOVA, Y. A. et al. Adhesion forces and cortical tension couple cell proliferation and differentiation to drive epidermal stratification. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 69–80, 11 jan. 2018.

MITSUTAKE, H.; POPPI, R.; BREITKREITZ, M. Raman Imaging Spectroscopy: History, Fundamentals and Current Scenario of the Technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2243–2258, 2019.

MOEENDARBARY, E.; HARRIS, A. R. Cell mechanics: principles, practices, and prospects. **WIREs Systems Biology and Medicine**, v. 6, n. 5, p. 371–388, 28 set. 2014.

MONTEIRO, V. V. S. et al. Aedes–Chikungunya Virus Interaction: Key Role of Vector Midguts Microbiota and Its Saliva in the Host Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 1–13, 9 abr. 2019.

MORONE, N. et al. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. **Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 6, p. 851–862, 11 set. 2006.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, n. 5, p. 493–541, set. 2007.

NG, L. F. P. et al. IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. e4261, 21 jan. 2009.

NOSS, E. H.; BRENNER, M. B. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 252–270, jun. 2008.

NOTINGHER, I. et al. Application of FTIR and Raman Spectroscopy to Characterisation of Bioactive Materials and Living Cells. **Spectroscopy**, v. 17, n. 2–3, p. 275–288, 2003.

OZDEN, S. et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e527, 13 jun. 2007.

PALAO, G. et al. Down-regulation of FLIP sensitizes rheumatoid synovial fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 9, p. 2803–2810, 2004.

PALUCH, E.; HEISENBERG, C.-P. Biology and Physics of Cell Shape Changes in Development. **Current Biology**, v. 19, n. 17, p. R790–R799, set. 2009.

PANORCHAN, P. et al. Nuclear Envelope Breakdown Requires Overcoming the Mechanical Integrity of the Nuclear Lamina. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 42, p. 43462–43467, out. 2004.

PAPPAS, D. Raman spectroscopy in bioanalysis. **Talanta**, v. 51, n. 1, p. 131–144, 24 jan. 2000.

PASTRANA, H. F. et al. Evaluation of the elastic Young's modulus and cytotoxicity variations in fibroblasts exposed to carbon-based nanomaterials. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, n. 1, p. 32, 23 dez. 2019.

PÁSZTÓI, M. et al. Gene expression and activity of cartilage degrading glycosidases in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. **Arthritis Research and Therapy**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2009.

PAUL, A. Biomechanical dependence of SARS-CoV-2 infections. **bioRxiv**, 2022.

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. **Elsevier - Virus Research**, v. 177, n. 2, p.

179–188, 2013.

POGODA, K. et al. Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data. **European Biophysics Journal**, v. 41, n. 1, p. 79–87, 27 jan. 2012.

POTT, F. et al. Single-cell transcriptomic analysis of antiviral responses and viral antagonism in Chikungunya virus-infected synovial fibroblasts. **bioRxiv**, p. 2020.06.07.138610, 2021.

POULALHON, N. et al. Modulation of Collagen and MMP-1 Gene Expression in Fibroblasts by the Immunosuppressive Drug Rapamycin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33045–33052, nov. 2006.

PRYDZ, K.; DALEN, K. T. Synthesis and sorting of proteoglycans. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 2, p. 193–205, 15 jan. 2000.

QUINTERO-FABIÁN, S. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. December, p. 1–21, 2019.

RAMAN, C. V. A Change of Wave-length in Light Scattering. **Nature**, v. 121, n. 3051, p. 619, 1928.

RAMAN, C. V. The Molecular Scattering of Light. **Nobel Lecture**, v. 69, n. 1775, p. 267–275, 4 jan. 1930.

RAMOS, J. R. et al. The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 447–457, 10 abr. 2014.

RODUIT, C. et al. Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 2, p. 674–677, jul. 2009.

ROSS, R. W. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.

ROTSCH, C. et al. AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. **Cell Biology International**, v. 21, n. 11, p. 685–696, nov. 1997.

ROUT, M. Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 12, p. 622–628, dez. 2003.

RUIZ SILVA, M. et al. Mechanism and role of MCP-1 upregulation upon chikungunya virus infection in human peripheral blood mononuclear cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32288, 25 out. 2016.

SALBREUX, G.; CHARRAS, G.; PALUCH, E. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 10, p. 536–545, out. 2012.

SATO, H. et al. Raman spectroscopy and its use for live cell and tissue analysis. **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, v. 7, n. 3–4, p. 97–104, 24 jan. 2019.

SCHAEFER, A. et al. Actin-binding proteins differentially regulate endothelial cell stiffness, ICAM-1 function and neutrophil transmigration. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 22, p. 4985–4985, 15 nov. 2014.

SCHILTE, C. et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on

- nonhematopoietic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 2, p. 429–442, 15 fev. 2010.
- SCHILTE, C. et al. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, 2013.
- SCHIRMER, E. C.; FOISNER, R. Proteins that associate with lamins: Many faces, many functions. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 10, p. 2167–2179, jun. 2007.
- SELVAMANI, S. P.; MISHRA, R.; SINGH, S. K. Chikungunya Virus Exploits miR-146a to Regulate NF- κ B Pathway in Human Synovial Fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–12, 2014.
- SFIKAKIS, P. P. et al. Cadherin-11 mRNA transcripts are frequently found in rheumatoid arthritis peripheral blood and correlate with established polyarthritis. **Elsevier - Clinical Immunology**, 2014.
- SHERVINGTON, L. et al. Identifying Reliable Diagnostic/Predictive Biomarkers for Rheumatoid Arthritis. **Biomarker Insights**, v. 13, p. 1–9, 2018.
- SHIN, J.-W. et al. Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 47, p. 18892–18897, 19 nov. 2013.
- SHIPP, D. W.; SINJAB, F.; NOTINGHER, I. Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. **Advances in Optics and Photonics**, v. 9, n. 2, p. 315, 30 jun. 2017.
- SILVA, L. A. et al. A Single-Amino-Acid Polymorphism in Chikungunya Virus E2 Glycoprotein Influences Glycosaminoglycan Utilization. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2385–2397, mar. 2014.
- SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- SNYDER, J. E. et al. Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. **Journal of Virology**, v. 87, n. 15, p. 8511–8523, ago. 2013.
- SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.
- SOONSAWAD, P. et al. Structural Evidence of Glycoprotein Assembly in Cellular Membrane Compartments prior to Alphavirus Budding. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11145–11151, nov. 2010.
- SORUSHANOVA, A. et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. **Advanced Materials**, v. 31, n. 1, p. 1801651, jan. 2019.
- SOURISSEAU, M. et al. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. e89, 29 jun. 2007.
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, set. 1994.

SU, J. et al. The promoting effect of MMP13 on mediating the development of HFLS-RA by the target of miR-19a through IL-17 signaling pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 10, p. 4282–4294, 21 out. 2020.

SU, Z. et al. Atomic Force Microscopy Study of the Anti-inflammatory Effects of Triptolide on Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes. **Microscopy and Microanalysis**, v. 23, n. 5, p. 1002–1012, 2017.

SUKKAEW, A. et al. Heterogeneity of clinical isolates of chikungunya virus and its impact on the responses of primary human fibroblast-like synoviocytes. **Journal of General Virology**, v. 99, p. 525–535, 2018.

SWIFT, J. et al. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. **Science**, v. 341, n. 6149, 30 ago. 2013.

TANABE, E. L. DE L. et al. Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, 23 abr. 2018.

TANABE, I. S. B. et al. Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 11, p. 730–733, 1 nov. 2019.

TANG, X. et al. A mechanically-induced colon cancer cell population shows increased metastatic potential. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 131, 29 dez. 2014.

TENG, T.-S. et al. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 12, p. 1925–1935, 15 jun. 2015.

TERENTIS, A. C. et al. Confocal Raman microspectroscopy discriminates live human metastatic melanoma and skin fibroblast cells. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 44, n. 9, p. 1205–1216, 2013.

THOMAS, S. et al. Functional dissection of the alphavirus capsid protease: sequence requirements for activity. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 327, 18 dez. 2010.

TSIKRITSIS, D.; ELFICK, A.; DOWNES, A. Raman spectroscopy of fibroblast cells from a Huntington's disease patient. **Spectroscopy Letters**, v. 49, n. 8, p. 535–541, 13 set. 2016.

VALENCIA, X. et al. Cadherin-11 Provides Specific Cellular Adhesion between Fibroblast-like Synoviocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 12, p. 1673–1679, 20 dez. 2004.

VERSIANI, A. F. et al. Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant Dengue virus 3 envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 26, 4 dez. 2017.

WAUQUIER, N. et al. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 115–123, 1 jul. 2011.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent

epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, 2015.

WEISS, P. A. The Molecular Control of Cellular Activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 12, n. 588, p. 1239–1240, 1963.

WEN, Y. et al. UDP-glucose dehydrogenase modulates proteoglycan synthesis in articular chondrocytes: its possible involvement and regulation in osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 6, p. 484, 3 dez. 2014.

WILSON, J. A. C. et al. **RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation**. [s.l: s.n.]. v. 13

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 18 dez. 2012.

ZERROUK, N. et al. Identification of putative master regulators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts using gene expression data and network inference. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16236, 1 dez. 2020.

ZHANG, R. et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 16 maio 2018.

ZHAO, T. et al. Vascular endothelial growth factor-D mediates fibrogenic response in myofibroblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 413, n. 1–2, p. 127–135, 2 fev. 2016.

ZHOU, Z. L. et al. Actin cytoskeleton stiffness grades metastatic potential of ovarian carcinoma Hey A8 cells via nanoindentation mapping. **Journal of Biomechanics**, v. 60, p. 219–226, jul. 2017.

ZWERGER, M.; HO, C. Y.; LAMMERDING, J. Nuclear Mechanics in Disease. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, n. 1, p. 397–428, 15 ago. 2011.

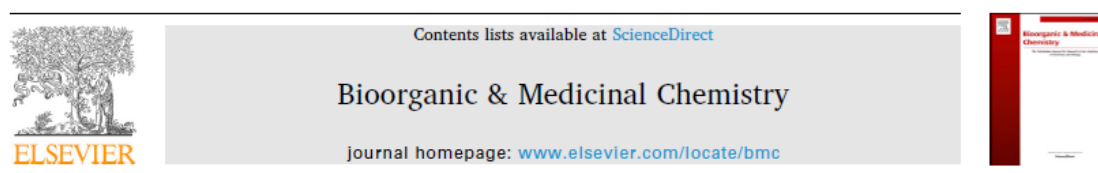
ANEXOS

- Produção científica ao longo do período de desenvolvimento do mestrado:

ANEXO A: Artigos publicados

Silva LR, da Silva Santos-Júnior PF, **de Andrade Brandão J**, Anderson L, Bassi ÊJ, Xavier de Araújo-Júnior J, Cardoso SH, da Silva-Júnior EF. Druggable targets from coronaviruses for designing new antiviral drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2020 Nov 15;28(22):115745. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115745.

Fator de impacto JCR (2021): 3.461



Druggable targets from coronaviruses for designing new antiviral drugs

Leandro Rocha Silva^{a,b}, Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior^a, Júlia de Andrade Brandão^c, Letícia Anderson^{c,d}, Ênio José Bassi^c, João Xavier de Araújo-Júnior^{a,e}, Sílvia Helena Cardoso^b, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{a,c,*}

^a Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

^b Laboratory of Organic and Medicinal Synthesis, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Manoel Severino Barbosa Avenue, Arapiraca 57309-005, Brazil

^c IMUNOREG – Immunoregulation Research Group, Laboratory of Research in Virology and Immunology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

^d CESMAC University Center, Cônego Machado Street, Maceió 57051-160, Brazil

^e Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV

SARS-CoV-2

MERS-CoV

Medicinal chemistry

Molecular modeling

ABSTRACT

Severe respiratory infections were highlighted in the SARS-CoV outbreak in 2002, as well as MERS-CoV, in 2012. Recently, the novel CoV (COVID-19) has led to severe respiratory damage to humans and deaths in Asia, Europe, and Americas, which allowed the WHO to declare the pandemic state. Notwithstanding all impacts caused by Coronaviruses, it is evident that the development of new antiviral agents is an unmet need. In this review, we provide a complete compilation of all potential antiviral agents targeting macromolecular structures from these Coronaviruses (*Coronaviridae*), providing a medicinal chemistry viewpoint that could be useful for designing new therapeutic agents.

ANEXO B: Artigos aceitos para publicação

Fragment-based design of α -cyanoacrylates and α -cyanoacrylamides targeting Dengue and Zika NS2B/NS3 proteases

Gabriel Gomes Vilela, Wadja Feitosa dos Santos Silva, Vitoria de Melo Batista, Leandro Rocha Silva, Hannah Maus, Stefan Josef Hammerschmidt, Clara Andrezza Crisóstomo Bezerra Costa, Orlando Francisco da Silva Moura, Johnnatan Duarte de Freitas, Grazielle Lobo Coelho, **Júlia de Andrade Brandão**, Letícia Anderson, Ênio José Bassi, João Xavier de Araújo-Júnior, Tanja Schirmeister, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior

Journal: **New Journal of Chemistry**

Manuscript ID: **NJ-ART-04-2022-001983.R1**

Fator de impacto JCR (2021): 3.925


NJC

[Home](#)
[Author](#)

Author Dashboard

Author Dashboard

1 Manuscripts I Have Co-Authored >

[Start New Submission](#) >

[5 Most Recent E-mails](#) >

Manuscripts I Have Co-Authored

Manuscript status explanation:

1. **Checking submission and files** - we are checking to see if your submission is complete and we have all the files we need.
2. **Initial assessment** - manuscript is undergoing [initial assessment](#).
3. **With editor** - manuscript is with the editor, either to select new or additional reviewers, or to make a decision following initial assessment or peer review.
4. **In peer review** - manuscript has been sent to reviewers.
5. **Accepted** - manuscript has been accepted for publication.

Please note that manuscripts can move back and forth between status 3 and 4.

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
- Accept (07-Sep-2022) - Passed to Production	NJ-ART-04-2022-001983.R1	Fragment-based design of α -cyanoacrylates and α -cyanoacrylamides targeting Dengue and Zika NS2B/NS3 proteases View Submission Submitting Author: Silva-Júnior, Edelildo	30-Jul-2022	30-Jul-2022

NJC



PAPER

View Article Online
[View Journal](#) | [View Issue](#)

Fragment-based design of α -cyanoacrylates and α -cyanoacrylamides targeting Dengue and Zika NS2B/NS3 proteases

Gabriel Gomes Vilela ^{a,b,1}, Wadja Feitosa dos Santos Silva ^{a,b,1}, Vitoria de Melo Batista ^b, Leandro Rocha Silva ^{a,b}, Hannah Maus ^c, Stefan Josef Hammerschmidt ^c, Clara Andreza Crisóstomo Bezerra Costa ^d, Orlando Francisco da Silva Moura ^d, Johnnatan Duarte de Freitas ^d, Grazielle Lobo Coelho ^e, Júlia de Andrade Brandão ^e, Leticia Anderson ^{e,f}, Énio José Bassi ^e, João Xavier de Araújo-Júnior ^b, Tanja Schirmeister ^c, Edelildo Ferreira da Silva-Júnior ^{a,b,*}

^a Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Lourival Melo Mota Avenue, AC. Simões campus, 57072-970, Alagoas, Maceió, Brazil.

^b Laboratory of Medicinal Chemistry, Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, Lourival Melo Mota Avenue, AC. Simões campus, 57072-970, Alagoas, Maceió, Brazil.

^c Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Johannes Gutenberg-University, Staudingerweg 5, 55128 Mainz, Germany.

^d Department of Chemistry, Federal Institute of Alagoas, Maceió campus, Mizaél Domingues Street, 57020-600, Alagoas, Maceió, Brazil.

^e Immunoregulation Research Group, Laboratory of Research in Virology and Immunology, Institute of Biological and Health Sciences, Lourival Melo Mota Avenue, AC. Simões campus, 57072-970, Alagoas, Maceió, Brazil.

^f CESMAC University Center, 57051-160, Alagoas, Maceió, Brazil.

* Corresponding author: Silva-Júnior, E.F.; email: edelildo.junior@iqb.ufal.br; Tel.: +55-82-9-9610-8311

¹ Authors contributed equally.

Abstract: Viruses belonging to the *Flaviviridae* family account for millions of cases of infections worldwide, mainly Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses. Both mosquito-borne flaviviruses are transmitted by bites of infected *Aedes* vectors, which are mainly endemic in tropical and sub-tropical countries. DENV and ZIKV are composed of structural and non-structural (NS) proteins that are initially expressed as a single precursor polyprotein. NS2B/NS3 is a serine protease complex that has a critical role during the viral replication cycle since the polyprotein processing is also accomplished by this enzyme. As an approach to developing novel NS2B/NS3 inhibitors, a virtual fragment-based drug design protocol was developed to select small fragments for new inhibitors. Based on this, we developed a series of α -cyanoacrylates and α -cyanoacrylamides targeting ZIKV and DENV NS2B/NS3 proteases. Among them, **LQM467**, **471**, **472**, and **474** were found to be active against both proteases, with IC_{50} values ranging from 17 to 39 μ M. Dynamics simulations revealed good stability during 200 ns for all enzyme inhibitor-complexes. Further, the MM/BSA approach revealed that these active compounds present similar energetic profiles, corroborating our experimental data. Additionally, docking analyses displayed that the compounds perform their binding modes with comparable binding poses, in which the catalytic residues are involved. Posteriorly, these compounds were screened for their cytotoxic effects, showing that **LQM474** is toxic to *Vero E6* cells. Thus, **LQM467**, **LQM471**, and **LQM472** were evaluated on ZIKV-infected cells to determine their antiviral potential. As a result, it was verified that **LQM471** is the most promising compound, exhibiting an EC_{50} value of 35.07 μ M. Finally, in order to obtain insights into its mechanism of action, a qPCR was performed. It was verified that **LQM471** is able to reduce the viral RNA copies compared to the untreated ZIKV-infected cells, suggesting that this compound can be a promising inhibitor of virus replication. This study presents an interesting alternative to design new hit compounds against DENV-2 and ZIKV NS2B/NS3 proteases contributing for the development of new therapeutic agents against these flaviviruses.

keywords: Michael acceptors; Competitive inhibitors; *In silico*; MM/BSA calculations; Rational drug design.

ANEXO C: Apresentações e publicações de trabalhos em anais de congressos nacionais e internacionais



Disponível em: www.event3.com.br/Anais/cbv2021/411036-ANTIVIRAL-ACTIVITY-OF-BIOCHANIN-A-AGAINST-CHIKUNGUNYA-VIRUS-IN-HUMAN-FIBROBLAST-LIKE-SYNOVIOCYTES-IN-VITRO



Disponível em: www.even3.com.br/Anais/cbv2021/411158-PROSPECTION-OF-MUTATIONS-AND-DETECTION-OF-EXPERIMENTAL-AND-PREDICTED-B-AND-T-CELL-EPITOPES-IN-CHIKUNGUNYA-VIRUS-E

Este trabalho também foi premiado com o Prêmio de melhor E-Pôster:



Disponível em: [www.even3.com.br/Anais/cbv2021/411337-CHIKUNGUNYA-VIRUS-MODULATES-CELL-SIGNALING-PATHWAYS-IN-INFECTED-HUMAN-FIBROBLAST-LIKE-SYNOVIOCYTES-\(HFLS\)-IN-VIT](http://www.even3.com.br/Anais/cbv2021/411337-CHIKUNGUNYA-VIRUS-MODULATES-CELL-SIGNALING-PATHWAYS-IN-INFECTED-HUMAN-FIBROBLAST-LIKE-SYNOVIOCYTES-(HFLS)-IN-VIT)



Disponível em: <https://icongresso.sbi.itarget.com.br/anais>. Work code: 985.