

Lianna Barbosa Loures

Investigação da resposta antioxidante no músculo esquelético e do impacto do tratamento com Monometil Fumarato (MMF) na infecção por alfavírus artritogênicos.



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

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

**Trabalho a ser realizado no Departamento
de Virologia, do Instituto de Microbiologia
Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação
do(a) Professor(a) Iranaia Assunção
Miranda.**

CIP - Catalogação na Publicação

L892i Loures, Lianna
Investigação da resposta antioxidante no músculo esquelético e do impacto do tratamento com Monometil Fumarato (MMF) na infecção por alfavírus artritogênicos. / Lianna Loures. -- Rio de Janeiro, 2024.
57 f.

Orientadora: Iranaia Assunção Miranda.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. Resposta antioxidante . 2. Chikungunya . 3. Mayaro. 4. Alfavírus Artritogênicos. I. Assunção Miranda, Iranaia , orient. II. Título.

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

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

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

ALUNO(A): LIANNA BARBOSA LOURES

DRE: 121055647

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Luciana Barros de Arruda (Presidente)
 Prof. Elena Montes Cobos
 Prof. Leticia de Albuquerque Maranhão Carneiro
 Prof. Anderson Guimarães (Suplente)

Título da Monografia: "Investigação da resposta antioxidante no músculo esquelético e do impacto do tratamento com Monometil Fumarato (MMF) na infecção por Alfvírus Artríticos"

Local: Sala vermelha, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Data e hora de início: 12 de dezembro de 2024 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi arguido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2024.

NOTA:

Banca Examinadora:

9,0

Luciana B. de Arruda

Prof. Luciana Barros de Arruda (Presidente)

9,0

Elena Montes Cobos

Prof. Elena Montes Cobos

9,0

Prof. Leticia de Albuquerque Maranhão Carneiro

Prof. Anderson Guimarães (Suplente)

Aluno(a):

Lianna Barbosa Loures

Lianna Barbosa Loures

**Orientador(a)
(e coorientador):**

Iracema Assunção Miranda

Prof. Iracema Assunção Miranda

**Coordenadora de
TCC:**

Marinella Silva Laport

Prof. Marinella Silva Laport

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos, cuja presença e apoio foram essenciais em cada etapa deste caminho, e aos meus professores, que inspiram meu aprendizado e crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Mariléia e Watesland, e à minha irmã, meus mais profundos agradecimentos por todo o apoio incondicional que me ofereceram ao longo desta trajetória. Desde que deixei a casa de vocês para estudar no Rio, vocês ficaram ao meu lado, me apoiaram, enfrentando comigo os desafios dessa jornada, acompanhando de perto cada conquista e dificuldade, mesmo que a distância nem sempre se torne tão fácil. Agradecer cada ida e vinda, a cada viagem feita para que eu me sentisse amparada e para que o lar nunca deixasse de estar presente, mesmo estado longe. Suas visitas, o apoio emocional constante e os sacrifícios que fizeram foram fundamentais para que eu me mantivesse motivada e determinada em cada etapa do processo, especialmente nos momentos mais desafiadores da monografia. Sou eternamente grata por todas as conversas, pelo incentivo e, principalmente, pelo amor incondicional que me impulsionou a seguir adiante. Sem vocês, esse sonho seria impossível, e este trabalho, sem dúvida, é também resultado da força que sempre encontro em vocês.

A toda minha família, meu sincero agradecimento por estar presente, mesmo que distante, em cada etapa desta jornada acadêmica. Pelo apoio constante, pelos conselhos e palavras de incentivo, agradecimento de coração. Vocês foram fundamentais em minha trajetória, e esse trabalho é um reflexo da força que sempre encontrei em cada um de vocês.

À minha amiga do colégio, Giovana, com quem compartilhei tantas memórias dos tempos de escola, meus profundos agradecimentos por sua amizade que resistiu à distância e ao tempo. Mesmo estando no Rio, longe, você nunca deixou de estar presente em minha vida e na minha trajetória durante a monografia. Sua presença foi essencial, mesmo que muitas vezes através de mensagens e chamadas, que trouxeram um alívio imenso nos momentos mais desafiadores. Nossas conversas, sejam sobre nossas escritas ou nos momentos de descontração, foram como um refresco em meio a correria e ao estresse deste trabalho. Agradeço a todos os conselhos, pela paciência e pela verdadeira amizade, que me sustentaram em tantas etapas desta caminhada. Sem você, essa jornada teria sido muito solitária e difícil, e por isso, levo comigo a certeza de que nossa amizade é um dos maiores presentes que a escola me deu.

Aos meus amigos de faculdade, Anna Luiza, Ana Luiza, Carlos e Matheus, que fomos nos encontrando com o tempo e o passar dos anos, meus sinceros agradecimentos por dividirem as dificuldades e alegrias comigo. Encontrar você no meio de tantas mudanças - de cidade, de fase de vida e enfrentar juntos as adaptações ordinárias pela pandemia – fez com que tudo se tornasse mais leve e mais suportável. Foram incontáveis os momentos de estudo, de incentivo mútuo, e também de descontração. Obrigada por fazerem parte dessa etapa tão significativa.

À minha orientadora, Iranaia, minha eterna gratidão pela paciência, confiança e orientação em todos os momentos desta caminhada. Suas lições, além de me ensinarem muito sobre ciência, me inspiraram a ser uma profissional mais ética e dedicada. Agradeço por todo o conhecimento compartilhado e pela generosidade com que me guiou.

Aos meus colegas de laboratório, Ana, Beatriz, Daniel, Iris, Leonardo, Luiza L., Luiza M., Mariana, Nathalia, Rafael, Renan e Rômulo, que estiveram ao meu lado durante todas as horas de trabalho, trocando experiências, orientando e compartilhando momentos de aprendizado, agradeço profundamente a parceria de vocês. O companheirismo e os momentos de descontração superaram as longas jornadas tornando-as mais leves e significativas, e o poio mútuo que tivemos foi essencial para enfrentarmos juntos os desafios que surgiram.

E não menos importante, não poderia deixar de agradecer de coração à Nathalia por toda orientação, dedicação, ensinamentos e amizade que me deu ao traçar meu caminho. Sua experiência e paciência foram fundamentais para o meu desenvolvimento no laboratório, e seu

apoio constante me deu segurança para aprimorar cada etapa deste projeto. E também tenho que agradecer ao Daniel, agradeço a generosidade e disponibilidade em me auxiliar nos experimentos. Sua experiência foi crucial para o sucesso de muitos dos resultados aqui apresentados, e sua orientação foi indispensável para meu aprendizado prático. Obrigado aos dois por toda a dedicação e amizade, vocês são os meus pais científicos e me inspiram a sempre ser melhor.

Ademais, agradeço ao Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, e a equipe do IMPG, a Universidade Federal do Rio de Janeiro por ter sido um espaço de crescimento, aprendizado e inspiração ao longo dessa jornada acadêmica. Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERJ que possibilitaram a realização do trabalho. E agradeço a banca pelo carinho em aceitar o convite e a disponibilidade para compartilharmos desse momento tão especial para mim.

"A ciência, para mim, explica parte da vida. Até onde chega, se baseia em acontecimentos, experiências e experimentos",

Rosalind Franklin

RESUMO

LIANNA BARBOSA LOURES

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E DO IMPACTO DO TRATAMENTO COM MONOMETIL FUMARATO (MMF) NA INFECÇÃO POR ALFAVÍRUS ARTRITOGÊNICOS

Orientador(a): Iranaia Assunção Miranda

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

Os vírus Chikungunya (CHIKV) e Mayaro (MAYV), são vírus envelopados pertencentes à família *Togaviridae*, do gênero *Alfavírus* e classificados como artritogênicos. A infecção por esses vírus está associada a uma doença febril marcada por um quadro de dores musculares e articulares intensas, que podem persistir por longos períodos, comprometendo a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Nosso grupo demonstrou que a infecção por esses vírus em camundongos jovens resulta em lesão e perda crônica de massa muscular esquelética associada à indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O aumento de ROS está associado a um desequilíbrio do estado redox, ocasionando o estresse oxidativo. Além disso, foi observado que a infecção de mioblastos e miotubos *in vitro* resulta em elevada produção de ROS. No contexto de estresse oxidativo, há a necessidade da ativação de vias de ação antioxidante, que irão reduzir as ROS, fazendo com que o organismo volte ao equilíbrio. A via NRF2 (fator nuclear derivado de eritroide 2) desempenha papel na regulação da resposta antioxidante, ao ser ativada, a NRF2 induz a expressão de enzimas antioxidantes que mitigam os danos celulares e promovem a recuperação do tecido celular. Visando investigar se a infecção por Alfavírus artritogênicos promove a indução da resposta antioxidante no músculo, de camundongos SV129 selvagens com 11 dias de nascimento foram infectados por via subcutânea com CHIKV e MAYV. As expressões dos genes associados a resposta antioxidante no músculo esquelético foram avaliadas por qPCR quantitativo, incluindo as enzimas GPX, HO-1, HIF-1 α , GSR, GCL e NADPH. Embora a infecção pelo CHIKV induza uma lesão muscular aguda associada à produção de ROS, não observamos o aumento na expressão das enzimas antioxidantes em 4 e 8 dias após a infecção (dpi). Em contraste, para o MAYV, observou-se uma indução da resposta antioxidante somente após a redução da carga viral em 8 dpi, com o aumento na expressão de GCL, GPX, HO-1, HIF-1 α , GSR e GCL. Buscando investigar o impacto da ativação das vias antioxidante na infecção de células musculares, nós utilizamos mioblastos e miotubos da linhagem C2C12 tratadas ou não com Monometil Fumarato (MMF), um agonista de NRF2. Inicialmente, realizamos ensaios de toxicidade do MMF em mioblasto e miotubos. E observamos que a concentração de 50 μ M era a mais segura para os testes em C2C12. Em seguida, o efeito do MMF foi avaliado em células C2C12 infectadas com CHIKV e MAYV. Nós observamos que tanto o pré-tratamento, quanto o

tratamento pós-adsorção diminuiu a morte celular, preservando a sua estrutura, sem alterar a replicação viral. Nossos dados indicam que o estresse oxidativo pode contribuir para a morte de células musculares e que o tratamento com MMF, pode conferir proteção às células C2C12, mostrando que essa é uma potencial via celular protetora na infecção por Alfavírus artritogênicos.

Palavras-chave: Resposta Antioxidante, Chikungunya, Mayaro, Alfavírus Artritogênicos

ABSTRACT

LIANNA BARBOSA LOURES

INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDANT RESPONSE IN SKELETAL MUSCLE AND THE IMPACT OF TREATMENT WITH MONOMETHYL FUMARATE (MMF) ON ASTHROGENIC ALPHAVIRUS INFECTION.

Orientado(a): Iranaia Assunção Miranda

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

The Chikungunya (CHIKV) and Mayaro (MAYV) viruses are enveloped viruses belonging to the Togaviridae family, of the Alphavirus genus and classified as arthritogenic. Infection with these viruses is associated with a febrile illness marked by intense muscle and joint pain, which can persist for long periods, compromising the quality of life of affected individuals. Our group has demonstrated that infection with these viruses in young mice results in injury and chronic loss of skeletal muscle mass associated with the induction of reactive oxygen species (ROS) production. The increase in ROS is associated with an imbalance in the redox state, causing oxidative stress. Furthermore, it has been observed that infection of myoblasts and myotubes in vitro results in elevated ROS production. In the context of oxidative stress, there is a need to activate antioxidant action pathways, which will reduce ROS, bringing the body back into balance. The NRF2 (nuclear factor erythroid-derived factor 2) pathway plays a role in regulating the antioxidant response. When activated, NRF2 induces the expression of antioxidant enzymes that mitigate cellular damage and promote cellular tissue recovery. Aiming to investigate whether infection with arthritogenic Alphaviruses promotes the induction of the antioxidant response in muscle, wild-type SV129 mice at 11 days of birth were subcutaneously infected with CHIKV and MAYV. The expressions of genes associated with the antioxidant response in skeletal muscle were evaluated by quantitative qPCR, including the enzymes GPX, HO-1, HIF-1 α , GSR, GCL and NADPH. Although CHIKV infection induces acute muscle injury associated with ROS production, we did not observe an increase in the expression of antioxidant enzymes at 4 and 8 days post-infection (dpi). In contrast, for MAYV, an induction of the antioxidant response was observed only after reducing the viral load at 8 dpi, with an increase in the expression of GCL, GPX, HO-1, HIF-1 α , GSR and GCL. Seeking to investigate the impact of the activation of antioxidant pathways on the infection of muscle cells, we used myoblasts and myotubes of the C2C12 lineage treated or not with Monomethyl Fumarate (MMF), an NRF2 agonist. Initially, we performed MMF toxicity assays in myoblasts and myotubes. And we observed that the concentration of 50 μ M was the safest for testing in C2C12. Next, the effect of MMF was evaluated in C2C12 cells infected with CHIKV and MAYV. We observed that both pre-treatment and post-adsorption treatment decreased cell death, preserving its structure, without altering viral replication. Our data

indicate that oxidative stress can contribute to the death of muscle cells and that treatment with MMF can provide protection to C2C12 cells, showing that this is a potential protective cellular pathway in arthritogenic Alphavirus infection.

Key-word: Antioxidant Response, Chikungunya, Mayaro, Arthritogenic Alphaviruses

RESUMO PARA LEIGOS

LIANNA BARBOSA LOURES

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E DO IMPACTO DO TRATAMENTO COM MONOMETIL FUMARATO (MMF) NA INFECÇÕES POR ALFAVÍRUS ARTRITOGÊNICOS

Orientador (a): Iranaia Assunção Miranda

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

Os vírus Chikungunya (CHIKV) e Mayaro (MAYV) são vírus que podem causar febre, dores fortes nos músculos e articulações, que muitas das vezes duram por longos períodos e afetam a qualidade de vida das pessoas infectadas, podendo ainda essas dores evoluírem para condições crônicas. Pesquisas feitas em camundongos demonstram que esses vírus causam danos nos músculos, como perda de massa muscular, devido a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são moléculas tóxicas que prejudicam as funções das células. Esse processo é conhecido como estresse oxidativo, e é um dos mecanismos pelos quais esses vírus comprometem o tecido muscular. Para proteger as células desses danos, o corpo utiliza mecanismos antioxidantes. Esses mecanismos ativam enzimas capazes de reduzir os efeitos das ROS minimizando os danos celulares e ajudando na recuperação dos tecidos lesionados. Querendo investigar a ativação das enzimas antioxidantes durante a infecção pelo CHIKV e MAYV, foram feitos experimentos em camundongos que demonstraram que, embora o CHIKV não promova a ativação da defesa antioxidante, o MAYV consegue induzir essa resposta antioxidante somente tardiamente. Visando compreender a influência da resposta antioxidante na infecção pelo CHIKV e MAYV, foram feitos estudos em células musculares. Essas células foram tratadas com um composto nomeado de Monometil fumarato (MMF), que ativa a expressão das enzimas antioxidantes. Os testes determinaram que a concentração segura para uso desse composto nas células é de 50 μ M. E ainda os resultados mostraram que o MMF protege células musculares contra os danos causados pela infecção, sem a alteração na quantidade de partículas virais. Esses resultados são promissores, pois sugerem que o MMF pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de tratamentos focados em reduzir os danos físicos causados por infecções com os CHIKV e MAYV, melhorando a qualidade de vida dos pacientes afetados.

ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
RESUMO PARA LEIGOS	XV
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Os Alfavírus.....	18
1.2 O vírus Chikungunya.	18
1.3 O vírus Mayaro	19
1.4 Manifestações clínica induzidas pelos alfavírus artritogênicos.....	21
1.5 Patogênese dos Alfavírus artritogênicos	23
1.6 Estresse oxidativo e resposta antioxidante	24
1.6.1 Papel em infecções virais	26
1.6.2 Terapias baseadas na ativação de NRF2.....	27
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Modelo experimental <i>in vivo</i>	32
4.2 Comitê de ética para análise experimental <i>in vivo</i>	32
4.3 Análise da expressão de enzimas antioxidantes.....	32
4.4 Propagação de estoques virais.....	33
4.5 Linhagem de células musculares esqueléticas.....	33
4.6 Replicação e tratamento em C2C12.....	34
4.7 Quantificação viral por ensaio de placas de lise	35
4.8 Ensaio de viabilidade celular.....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 A infecção em modelos de lesão grave pelo MAYV, mas não pelo CHIKV induz o aumento da expressão de enzimas antioxidantes no tecido muscular.....	36
5.2 O MMF apresentou baixa toxicidade em 50 μ M em células da linhagem C2C12.....	39
5.3 O tratamento com MMF reduz a morte celular de mioblastos e miotubos sem alteração na replicação viral.....	40

6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os Alfavírus

Os vírus do gênero *Alphavirus* constituem um amplo grupo de vírus pertencentes à família *Togoviridae*. Esse gênero compreende mais de 30 espécies conhecidas, a maioria das quais são transmitidas por diferentes espécies de mosquito vetores encontrados nas regiões tropicais e subtropicais (Chen, *et al.*, 2018).

A partícula dos Alfavírus é formada com genoma de RNA de fita simples e sentido positivo (+ssRNA) com cerca de 12 quilobases de comprimento sendo revestidos por um capsídeo e um envelope (Mendes, Kuhn, 2018). O genoma apresenta em suas extremidades uma região CAP 5' e uma cauda poli(A) 3'. Além disso, o genoma possui dois domínios: um domínio não estrutural que codifica as proteínas não estruturais (nsP) na porção 5' terminal, e um domínio estrutural que codifica as proteínas estruturais na porção 3' terminal (Azar, Campos, *et al.*, 2020).

Os membros do gênero *Alphavirus* podem ser divididos em dois grupos de acordo com sua relação genética e manifestação clínica (Kim, Diamond, 2022). Os Alphavirus encefálicos, como o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Vírus da Encefalite Equina de Ocidental (WEEV) e o Vírus da Encefalite Equina de Oriental (EEEV), em que a infecção resulta em manifestações neurológicas potencialmente fatais (Mostafavi, Eranga Abeyratne, *et al.*, 2019). E os Alphavirus artritogênicos, em que a infecção é marcada por fortes dores musculares e articulares incapacitantes, como os vírus Chikungunya (CHIKV), vírus o'nyong-nyong (ONNV), vírus Ross River (RRV), vírus Barmah Forest (BFV), vírus Mayaro (MAYV), vírus Sindbis (SINV) e vírus Semliki Forest (SFV) (Kim, Diamond, 2022; Mostafavi, Eranga Abeyratne, *et al.*, 2019).

1.2. O vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi isolado pela primeira vez na Tanzânia, na África, em 1952. Posteriormente a sua identificação, foram relatados diversos surtos pela África e Ásia entre 1960 e 1980 com uma redução no número de surtos/casos até 2004. Em 2004, se inicia um novo grande surto que ocorreu na ilha Lamu, Quênia, onde 70% da ilha foi infectada. A epidemia então se espalhou para outras ilhas, como Comores, La Réunion nas Saicheles, Ilhas Maurício, Madagascar e Mayotte, tendo relatos de casos graves, (Zeller, Bortel, *et al.*, 2016).

Já foram isoladas 4 linhagens distintas de CHIKV pelo mundo sendo elas a linhagem Asiática, a ECSA (linhagem enzoótica da África Oriental, Central e do Sul), a IOL (linhagem epidêmica do Oceano Índico) e a linhagem do Oeste Africano, tendo as duas primeiras delas circulando no Brasil (Chen, Plante, *et al.*, 2021). Uma análise genética do genótipo ECSA identificou uma mutação no resíduo 226 de glicoproteína de fusão de membrana E1 do vírus em 2005, o que levou ao aumento das taxas de replicação viral no vetor. Essa mutação possibilitou ao vírus uma maior distribuição geográfica, uma disseminação mais eficiente pelo *Ae. albopictus* e uma ampla transmissão, tendo casos relatados na Europa, Ásia e África (Zeller, Bortel, *et al.*, 2016; Suchowiecki, Reid, *et al.*, 2021).

Nas Américas o primeiro caso foi relatado em dezembro de 2013, em um conjunto de casos clínicos com início de doença febril que levou a identificação de mais de 1,2 milhão de casos autóctones de CHIKV reportados a Organização Pan-Americana da Saúde no período de 2013 a 2014 (Zeller, Bortel, *et al.*, 2016; Mostafavi, Eranga Abeyratne, *et al.*, 2019). Atualmente há transmissão local de CHIKV em diversos países do mundo, atingindo principalmente regiões tropicais e subtropicais (Freppel, Silva *et al.*, 2024). Epidemias recentes têm sido facilitadas por mutações nas glicoproteínas de envelope o que resulta em uma melhor adaptação do CHIKV a transmissão pelo *A. albopictus*, que sobrevive a locais mais frios como as regiões temperadas do globo (Zeller, Bortel, *et al.*, 2016; Fernanda, *et al.*, 2019)

O principal vetor do CHIKV é o *Aedes aegypti*, também sendo transmitido pelo *Ae. Albopictus*, que são mosquitos bem adaptados a todas as condições do Brasil, vivendo disseminadamente por todo o país. Além dos dois mosquitos *Aedes*, não se sabe se outras espécies de *Culicidae*, que também são de áreas urbanas, são capazes de transmitir o CHIKV (Costa-da-Silva, Ioshino, *et al.*, 2017).

1.3. O vírus Mayaro

O MAYV foi isolado pela primeira vez de cinco trabalhadores no condado de Mayaro em Trinidad, no Caribe, em 1954, e tem mantido sua circulação restrita a regiões da América Central e do Sul já sendo responsável por surtos esporádicos na Bolívia, Peru, Brasil, Venezuela, Equador e Guiana francesa (Mourão, Bastos, *et al.*, 2011; Auguste, Liria, *et al.*, 2015; Acosta-Ampudia, Monsalve, *et al.*, 2018; Fernanda, *et al.*, 2019; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020; Wei, Tom, 2024). Além dos surtos esporádicos pela América do Sul, indivíduos nativos da Amazônia têm maior soroprevalência da infecção pelo MAYV do que indivíduos de outras

áreas (Izurieta, Macaluso, *et al.*, 2011). Atualmente o MAYV é responsável por epidemias na Bolívia, no Peru e no Brasil e em viajantes na América do Norte e Europa (Esposito & Fonseca, 2017; Fernanda, *et al.*, 2019).

No Brasil o primeiro caso reportado foi em 1955 em trabalhadores rurais em Belém do Pará (Fernanda, *et al.*, 2019). Desde então vários surtos de febre do Mayaro foram relatados em diferentes estados brasileiros, como no Pará em 1977 e 2007-2008; no Amazonas, em 1998-1999 e 2007-2008, e no Mato Grosso, em 2011-2012, sendo predominantemente em trabalhadores ou moradores de áreas rurais, além de casos em viajantes reportado em São Paulo (Cavalheiro, Silva, *et al.*, 2016; Ganjian, Riviere-Cinnamond, 2020). E além desses casos identificados durante os surtos ou identificados por sorologia há casos de MAYV que podem passar despercebidos ou serem diagnosticados erroneamente como Dengue ou Chikungunya, devido à proximidade dos sintomas a outras arboviroses e o fato de os testes de diagnóstico não serem amplamente distribuídos (Ganjian, Riviere-Cinnamond, 2020).

O aumento da expansão demográfica, da exploração de florestas e mudanças climáticas, assim como a migração humana tem facilitam a disseminação do MAYV, a cada ano há um aumento na detecção de casos de infecção pelo MAYV em áreas urbanas, já sendo detectado em áreas urbanas do Pará, Mato grosso e Goiás (Pereira, Carvalho, *et al.*, 2020). Apesar de os vetores e hospedeiros do MAYV restringirem a maioria dos surtos a áreas rurais, há fatores que sugerem a possibilidade da urbanização do MAYV, a recorrência de casos em áreas próximas a cidades em que há o *Ae. aegypti* de forma endêmica e a disseminação por viajantes doentes (Acosta-Ampudia, Monsalve, *et al.*, 2018).

O principal vetor do MAYV são as fêmeas pertencentes ao gênero *Haemagogus*, porém já foram isoladas partículas virais de mosquitos de outros gêneros, como *Culex*, *Mansonia*, *Aedes*, *Psorophora* e *Sabethes* (Acosta-Ampudia, Monsalve, *et al.*, 2018). Estudos de vigilância demonstraram a circulação e dispersão do MAYV para áreas não relatadas anteriormente, bem como a detecção de infecções humanas em ambientes urbanos, facilitando a transmissão por vetores urbanos, como o *Ae. aegypti* que é amplamente distribuído por todo o mundo (Andreolla, Borges, *et al.*, 2022). O MAYV apresenta diferentes vertebrados como hospedeiros na natureza, já tendo sido detectado em primatas não humanos, roedores, pássaros e pequenos mamíferos, que fazem parte do ciclo silvestre do MAYV (Thoisy, Gardon, *et al.*, 2003).

1.4. Manifestações clínicas induzidas pelos alfavírus artritogênicos

A infecção pelos Alfavírus artritogênicos apresenta um período de incubação de 1 a 12 dias com período curto de viremia, porém com grande produção de partículas virais (Suchowiecki, Reid, *et al.*, 2021). Após esse período de incubação se inicia a fase aguda com sintomas como febre, dor de cabeça, erupção cutânea, mialgia, poliartralgia e poliartrite, tendo as taxas de sintomáticos variando de 72-97% para CHIKV e 64-80% para o MAYV (Levi, Vignuzzi, 2019; Baxter, Heise, 2020) (**Figura 1**). A artralgia e a mialgia são as principais manifestações clínicas, podendo ocorrer em 85-100% das pessoas sintomáticas (Santiago, Halsey, *et al.*, 2015; Goupil, Mores, 2016; Levi, Vignuzzi, 2019). Também já foi relatado que o CHIKV, mesmo que em menor proporção, pode levar a um quadro com alterações neurológicas, como encefalites e cardíacas, como miocardite, potencialmente letais (Economopoulou, Dominguez, *et al.*, 2008; Mohite, Fernandez, 2015). Além disso, pode estar relacionado a morte de pacientes idosos, com comorbidades e neonatos, tendo a taxa de mortalidade de 0,01-0,1% (Simon, Javelle, *et al.*, 2015; Dorléans, Hoen, *et al.*, 2018). Tontura e coceira podem ser sintomas da infecção pelo MAYV, e complicações mais graves, como miocardite, manifestações hemorrágicas e neurológicas, são raras (Acosta-Ampudia, Monsalve, *et al.*, 2018; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020; Wei, Tom, *et al.*, 2024).

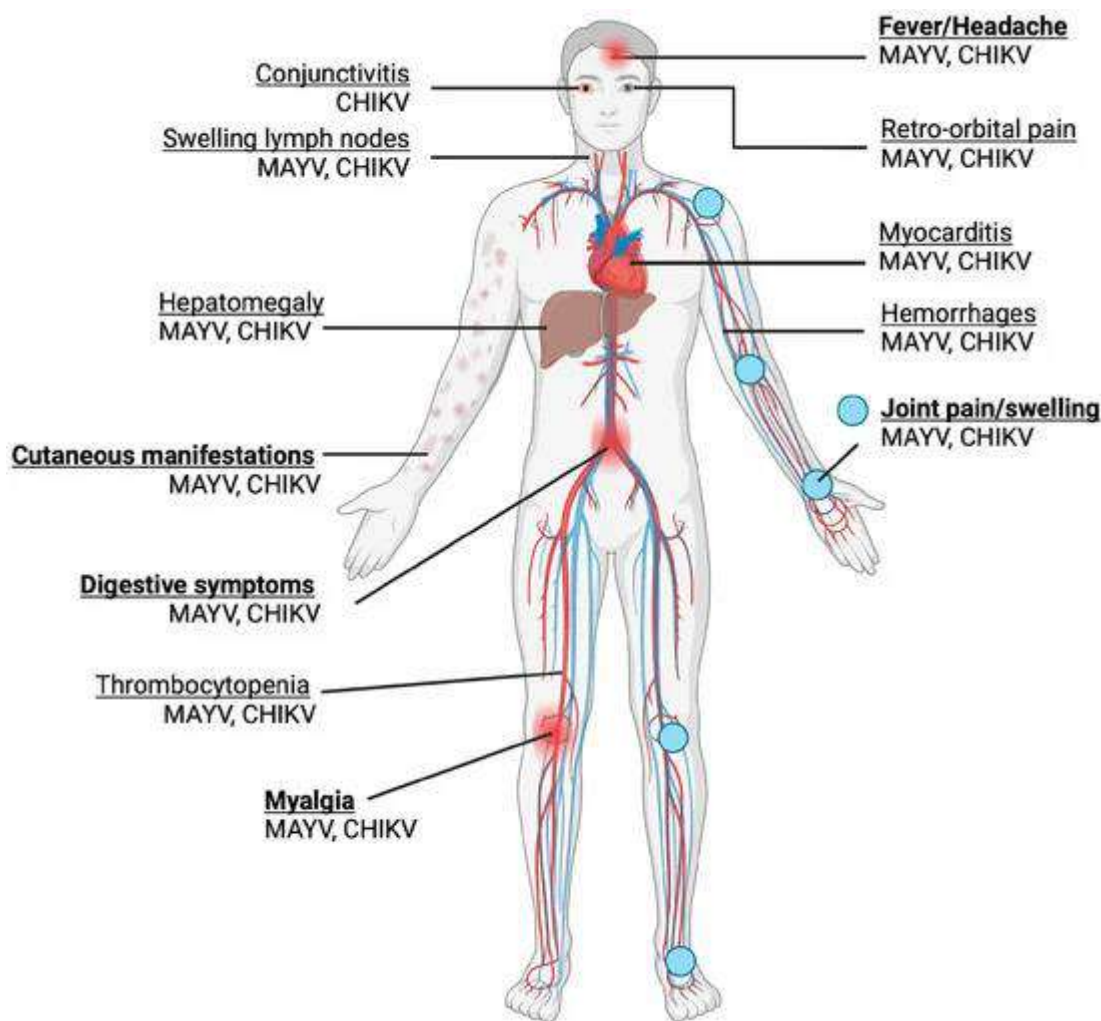


Figura 1: Os sintomas e sinais clínicos da infecção por MAYV e CHIKV . Os sintomas agudos estão em negrito. Dor e inchaço nas articulações são os sintomas mais comuns. A maioria dos sintomas é compartilhada, com exceção da conjuntivite, que é associada ao CHIKV, mas não ao MAYV (Wei, Tom, *et al.*, 2024).

Estudos anteriores mostraram que cerca de 60% dos pacientes infectados pelo CHIKV e 50% pelo MAYV chegam a se recuperar e têm a resolução da doença. Porém, os restantes manifestam sintomas de forma persistente, por até 3 meses, e podem evoluir para uma fase crônica, onde as manifestações podem persistir por meses e até mesmo anos (Santiago, Halsey, *et al.*, 2015; Ng, Amaral, *et al.*, 2024). A fase crônica da infecção por Alfavírus artrítogênicos é caracterizada pela persistência dos sintomas de dor muscular, artrite e artralgia incapacitantes. As manifestações que também costumam se apresentar são a fadiga, inchaço articular, poliartrite e poliartralgia, atingindo qualquer articulação do corpo (Dupuis-Maguiraga, Noret, *et al.*, 2012; Acosta-Ampudia, Monsalve, *et al.*, 2018; Ng, Amaral, *et al.*, 2024), sendo as articulações das mãos, joelhos, punho, tornozelo, pé, cotovelo e ombro as mais afetadas (Wei, Tom, *et al.*, 2024).

A fase crônica não tem fatores únicos que ditam quais pacientes infectados irão evoluir a ela, porém a idade do paciente, acima de 45 anos, a carga viral durante a fase aguda e a resposta imunológica gerada pelo indivíduo são grandes influências para o desenvolvimento dos sintomas crônicos (Zaid, Gérardin, *et al.*, 2017; Pathak, Mohan, *et al.*, 2019). Apesar da baixa mortalidade, a cronicidade dos sintomas incapacitantes impacta de forma muito significativa na vida dos indivíduos acometidos, o que ressalta a necessidade de estratégias diagnósticas e terapêuticas novas, objetivando mitigar os efeitos debilitantes da doença.

1.5. Patogênese dos alfavírus artritogênicos.

Após a inoculação viral na derme, pela picada do mosquito vetor, os alfavírus infectam principalmente fibroblastos, mas também há evidências de replicação em queratinócitos e células imunes residentes, como macrófagos e células dendríticas (Cavalcante, Pereira, *et al.*, 2022). Essa replicação leva a produção de mediadores inflamatórios que alteram a permeabilidade capilar e atraem células para o local. Os neutrófilos são umas das primeiras células a serem recrutadas, liberando espécies reativas de oxigênio (ROS) e formando armadilhas extracelulares de neutrófilo (NETs), com o fim de diminuir e capturar as partículas virais de forma imediata após a infecção (Suchowiecki, Reid, *et al.*, 2021; Freppel, Silva, *et al.*, 2024). Após a replicação local o vírus se dissemina pela via linfática e corrente sanguínea, facilitando a chegada aos tecidos articulares e musculares (Diagne, Bengue, *et al.*, 2020; Freppel, Silva, *et al.*, 2024).

A indução de IFN tipo I (IFN α/β) é considerada uma das principais respostas para o controle da infecção por alfavírus artritogênicos. O IFN- α , bem como outras citocinas e quimiocinas são liberadas durante a infecção (Mostafavi, Eranga Abeyratne, *et al.*, 2019). Esses mediadores são detectados em altos níveis no plasma de pacientes com infecção aguda e crônica pelo CHIKV e MAYV.

Estudos longitudinais avaliando indivíduos infectados pelo CHIKV e MAYV demonstram que há uma robusta e persistente resposta pró-inflamatória sistêmica e musculo articular, marcada pelo aumento de IL-6, MCP-1, IL-7, IL-8, IL-15, G-CSF, IFN- γ , VEGF, TNF- α e CCL2 no soro na fase aguda, com manutenção dos níveis elevados de IL-1 β , IL-5, IL-17, IFN- γ e TNF, na fase crônica (Ng, Chow, *et al.*, 2009; Horau *et al.*, 2010; Wauquier, Becquart, *et al.*, 2010; Hawman *et al.*, 2019; Santiago *et al.*, 2019; Chirathaworn, Chansaenroj, *et al.*, 2020; Freppel, Silva, *et al.*, 2024).

Análise de biópsias de músculos de pacientes demonstram que a dor muscular na fase aguda e crônica está associada a infiltrado inflamatório, áreas de atrofia, necrose, com a presença de áreas de fibrose na fase crônica (Ozden, Huerre et al. 2007). Entretanto, existem muitas lacunas na compreensão dos mecanismos de exacerbação da resposta imune, principalmente em casos de persistência da inflamação articular e muscular.

Estudos *in vitro* e em modelos murinos, demonstraram que as células do músculo esquelético são suscetíveis e permissivas à infecção por estes vírus, bem como as que compõem os ossos e articulações (Sane et al., 2012; Lim et al., 2018; Bengue et al., 2019; Matusali et al., 2019, Figueiredo et al., 2019). IL-6 e TNF- α nos estágios iniciais foram relacionados à dor em modelos animais infectados pelo MAYV (Santos, Dias, *et al.*, 2019). Ainda, o aumento dos níveis de IL-6, TNF- α , IL-1 β e ROS foram associados a indução de atrofia muscular crônica em modelo experimental de lesão grave pelo CHUKV e MAYV (Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024).

Embora os mecanismos que levam um paciente ao desenvolvimento dessa fase ainda não sejam completamente compreendidos, há hipóteses de que fatores como a resposta imunológica do hospedeiro, a presença de antígenos virais nos tecidos e a carga viral podem desempenhar um papel importante nesse processo (Mostafavi, Eranga Abeyratne, *et al.*, 2019). Ainda, outros trabalhos já demonstraram que o músculo esquelético também é um sítio de persistência viral, o que pode estar associado manutenção da resposta inflamatória (Soden et al., 2000; Ozden et al., 2007; Labadie et al., 2010; Hoarau et al., 2010; Messaoudi et al., 2013; Young et al., 2019). Além disso, o RNA viral também é encontrado em células musculares, como mioblastos e fibroblasto de forma persistente em humanos, bem como em modelos experimentais (Young, Locke, *et al.*, 2019). Desta forma, estes dados indicam a importância do músculo esquelético na patogênese da doença causada por alfavírus artrítogênicos, além do comprometimento do tecido muscular pós-infecção.

1.6. Estresse oxidativo e resposta antioxidante

O estresse oxidativo (EO) é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante do organismo, que pode resultar em danos aos sistemas biológicos. Os ânions superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH⁻) são os representantes mais comuns das ROS (Forman, Zhang, 2021; Jaganjac, M., Milkovic, *et al.*, 2022). As ROS são ligadas a diversos mecanismos celulares,

sendo produzidos em processos fisiológicos normais, como no metabolismo mitocondrial durante a fosforilação oxidativa, ou por estímulos externos como a radiação ultravioleta e infecções (Jaganjac, M., Milkovic, *et al.*, 2022). O equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes devem ser bem controlados visando manter a integridade celular e evitar o EO. Essa produção de ROS é controlada pela defesa antioxidante que protege as células de eventuais danos, ela é composta principalmente por sistemas enzimáticos e não enzimáticos, incluindo enzimas antioxidantes como Superóxido dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPX) e Heme-oxigenase (HO-1), sendo controlados principalmente pela via NRF2 (fator nuclear eritroide 2) (Camini, Silva, *et al.*, 2017; Jaganjac, M., Milkovic, *et al.*, 2022)

Em condições de homeostase, há o equilíbrio na produção de ROS e na produção da defesa antioxidante, porém em condições patológicas, pode haver a indução da expressão de ROS o que quebraria o equilíbrio, podendo resultar em danos celulares e piora na patologia (Sadasivam, Kim, *et al.*, 2022). As moléculas de ROS podem ser geradas como parte da resposta imune do hospedeiro para combater a infecção e/ou inflamação, sendo produzidas por diversos tipos celulares e utilizadas como mensageiros na sinalização celular (**Figura 2.**) (Caminia, Caetano, *et al.*, 2017). Em estudos sobre o câncer de diversos órgão, do Alzheimer de doenças hepáticas e de infecções virais o EO foi relatado como uma de suas patogêneses e que pode agravar a patologia (Caminia, Caetano, *et al.*, 2017; Jelic, Mandic, *et al.*, 2019; Bai, Guo, *et al.*, 2022; Sadasivam, Kim, *et al.*, 2022; Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024).

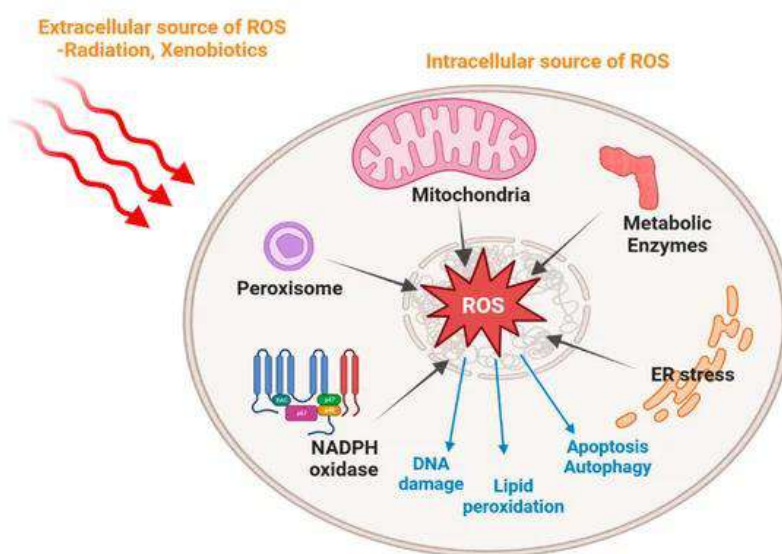


Figura 2. Representação esquemática do estresse oxidativo induzido por estímulos intracelulares e extracelulares. Fontes extracelulares de ROS incluem fatores ambientais como radiação e xenobióticos. ROS intracelulares são gerados principalmente nas mitocôndrias, bem como em outras organelas como o peroxissomo

e o retículo endoplasmático, e, além disso, por algumas enzimas metabólicas. A produção excessiva de ROS pode levar à apoptose celular, autofagia, peroxidação lipídica e danos ao DNA (Hong, Boiti, *et al.*, 2024)

1.6.1. Papel em infecções virais

As ROS desempenham um papel importante na manutenção de processos celulares e sinalização fisiológica, sendo particularmente relevantes durante as infecções virais. Inicialmente, os ROS são produzidos como parte da resposta imune inata, principalmente por neutrófilos ativados, que utilizam explosões oxidativas para destruir vírus e células infectadas. Esses mecanismos contribuem para a ativação da resposta antiviral, mas à medida que a replicação viral é progressiva, a produção exacerbada de ROS pode levar ao desequilíbrio redox e ao desenvolvimento de EO (Caminía, Caetano, *et al.*, 2017).

Estudos demonstraram que diversas infecções virais induzem a produção de ROS. Por exemplo, o CHIKV e o MAYV que induzem a produção de ROS em células da linhagem de Hepatócito Humanos (HepG2) e no tecido muscular em modelo murino, causando estresse oxidativo (Caminía, Caetano, *et al.*, 2017; Caetano, Camini, *et al.*, 2019; Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024). De forma semelhante, o vírus da dengue estimula a produção de ROS em células epiteliais, contribuindo para o dano (Khan, Kar, *et al.*, 2021). Já o vírus Zika induz ROS em tanto em células HepG2 quanto em células U87-MG (linhagem de células de glioblastoma humano) (Almeida, Ferraz, *et al.*, 2020).

Em infecção por Alfavírus artritogênicos, como o CHIKV e MAYV, a combinação entre a replicação viral, a ativação de mediadores inflamatórios e a indução de ROS está associada a lesões teciduais e perda de massa muscular. Esses fatores resultam em atrofia muscular aguda e crônica, sendo este último estágio mais debilitante dessa infecção (**Figura 3.**) (Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024). Por outro lado, alguns vírus, como o Epstein-Barr, regulam níveis de produção de ROS. Essa estratégia permite evitar a morte celular precoce, promovendo uma replicação viral mais persistente, o que ilustra como o vírus pode manipular o equilíbrio redox em benefício próprio (Sausen, Bhutta, *et al.*, 2021).

A complexidade do impacto das ROS nas infecções virais ressalta a necessidade de estratégias terapêuticas, como o uso de antioxidantes, que podem mitigar os danos ao hospedeiro. Entretanto, mais estudos são necessários para explorar como diferentes vírus modulam as vias oxidativas e para identificar instruções específicas que equilibrem a defesa antiviral e a proteção dos tecidos do hospedeiro

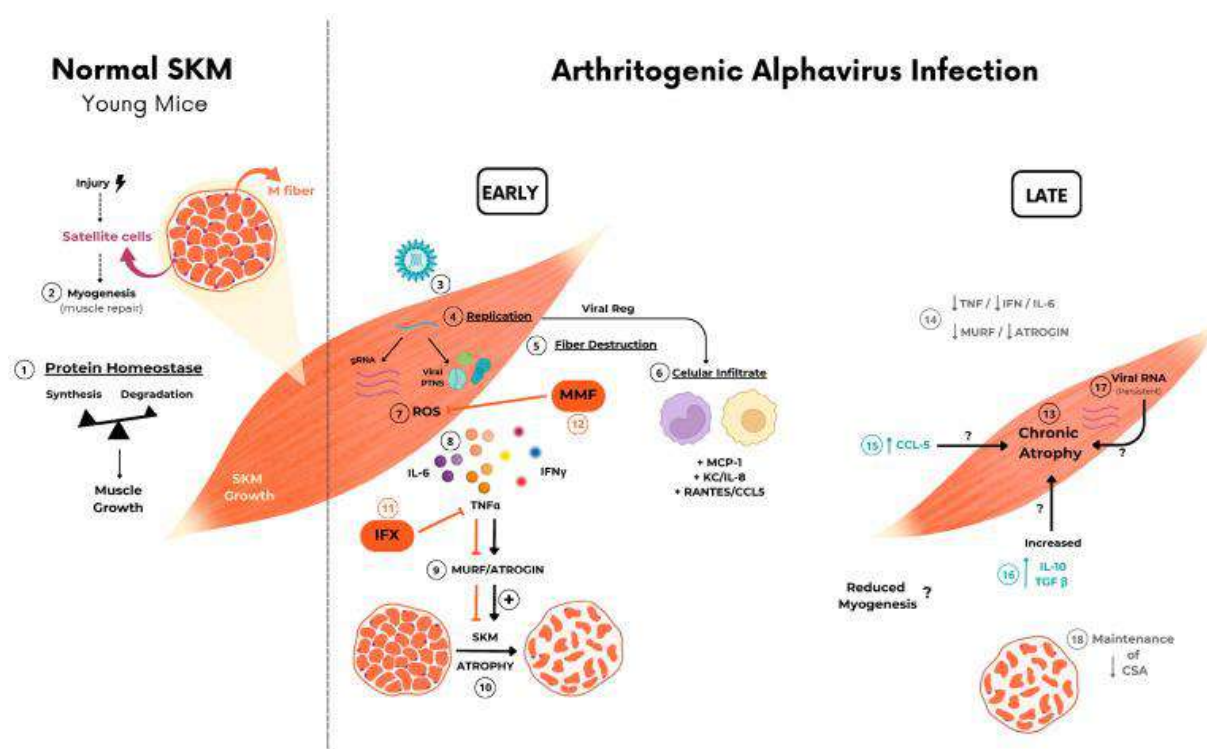


Figura 3. Representação esquemática do possível mecanismo envolvido na atrofia muscular esquelética precoce e tardia induzida por alfavírus artritogênico. 1 Em condições fisiológicas, o crescimento das fibras musculares esqueléticas (SkM) em camundongos jovens ao longo da vida é determinado pelo aumento individual das fibras musculares e pelo ganho de massa, onde a taxa de síntese de proteínas é maior do que a de degradação. 2- A geração de novas fibras por miogênese ocorre principalmente após lesão, com ativação de células satélites que estavam em repouso. 3-8 O alfavírus artritogênico se replica nas fibras musculares esqueléticas, resultando em destruição das fibras, recrutamento de células imunológicas e produção de mediadores inflamatórios na fase inicial da infecção. 9-10 A degradação de proteínas induzida pela inflamação ocorre através do sistema UPS (proteassoma ubiquitina) com ativação das proteínas MuRF1 e Atrogin-1, levando à atrofia aguda do músculo esquelético. 11-12 O tratamento com IFX (infleximabe) ou MMF (monometilfumarato) reduz a degradação de proteínas e a atrofia, corroborando o envolvimento dessas vias na atrofia induzida pelos vírus MAYV e CHIKV. 13 A atrofia do músculo esquelético persiste na fase tardia da infecção. 14 Apesar da diminuição dos níveis de TNF, IFN γ e IL-6, bem como da expressão de atroginas, 15-17 quimiocinas, mediadores como IL-10, TGF β e RNA genômico viral ainda são detectados, indicando uma depuração viral incompleta. 18 A ativação imune de longo prazo resulta na redução da área de secção transversal (CSA) do músculo por um mecanismo independente do sistema UPS: — bloqueio/inibição; + regulação positiva; ? perguntas abertas

1.6.2. Terapias baseadas na ativação de NRF2

O NRF2, um fator de transcrição central para a defesa antioxidante, e da manutenção da homeostase redox celular. Ele desempenha um papel crítico na defesa contra o EO, na toxicidade ambiental e na inflamação crônica. Em condições de EO, NRF2 é liberado de sua interação com a proteína KEAP1 (proteína 1 associada à ECH semelhante a Kelch), transloca para o núcleo e ativa a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, como SOD e outros. Essas enzimas neutralizam ROS, protegendo as células contra danos ao DNA, proteínas e lipídios (Kasai, Shimizu, *et al*, 2020).

No contexto de infecções virais, como as causadas pelos CHIKV e MAYV, há um aumento significativo na produção de ROS, que traz tanto para ativação da resposta imune quanto para lesões teciduais, especialmente em músculos. Estudos indicam que estratégias terapêuticas que modulam a via antioxidante regulada pelo NRF2 podem ter um papel promissor no controle da replicação viral e na redução dos danos induzidos por Alfvírus artritogênicos. A ativação do NRF2 não apenas mostrou diminuir o dano oxidativo causado pela infecção, mas também pode mitigar a inflamação crônica associada à persistência viral e ao desenvolvimento da fase crônica (Foo, Bellot, *et al.*, 2022; Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024).

Sendo assim medicamentos como o Monometil Fumarato (MMF), Bardoxolona metil (BM) e Sulfarofano (SFN) são medicamentos que modulam as vias antioxidantes por meio da NRF2 e tem sido explorado por suas propriedades antioxidantes (Timpani, Rybalka, 2020; Pang, Jiang, *et al.*, 2021; Kaiser, Baniasadi, *et al.*, 2021).

O MMF é um éster simples do ácido fumárico, utilizado no tratamento da esclerose múltipla, conhecido por seu efeito antioxidante e imunomodulador. Ao ativar a Nrf2, o MMF promove a expressão de genes que neutralizam as ROS, além de inibir o fator nuclear kappa B (NF-κB), responsável por exacerbar a inflamação, e ativar o receptor ácido hidroxicarboxílico 2 (HCAR2), que modula a resposta imunológica local, e a infiltração, adesão e quimiotaxia de células imunológicas (**Figura 4.**) (Timpani, Rybalka, 2020).

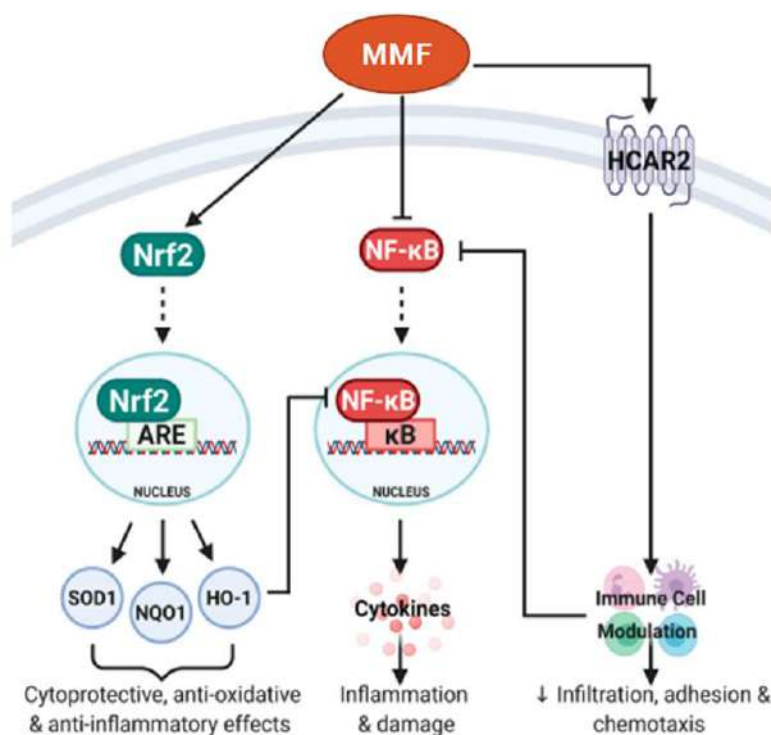


Figura 4. Esquema das vias ativadas pelo Monometil fumarato (MMF). Sabe-se que o MMF tem seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e imunomoduladores através da ativação do fator nuclear eritróide 2 (NRF2), que se liga a ARE (elemento de resposta antioxidante) no núcleo para ativar a transcrição de enzimas antioxidantes, como Superóxido desmutase 1 (SOD1), NAD(P)H quinona oxidoredutase (NQO1) e heme oxigenase 1 (HO-1). Ambos medeiam os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e citoprotetores. As produções dessas enzimas também podem levar a inibição do NF- κ B (Fator nuclear kappa B) e o MMF também tem efeito direto sobre a inibição do NF- κ B. Por fim os efeitos imunomoduladores são mediados pela HCAR2, que modula as células inflamatórias para anti-inflamatórias também inibindo o NF- κ B. (Gill, Kolson, 2013 – Adaptado)

Em estudos anteriores do nosso grupo do laboratório foi possível a observação que a infecção pelo CHIKV e MAYV em modelo experimental resulta em perda crônica de massa muscular esquelética associada a indução da produção de ROS. E que esse efeito pode ser revertido a partir da ativação de um ambiente antioxidante através do pré-tratamento com o composto Monometil Fumarato (MMF), um agonista da via NRF2. (**Figura 5.**) (Oliveira, Figueiredo, *et al*, 2024).

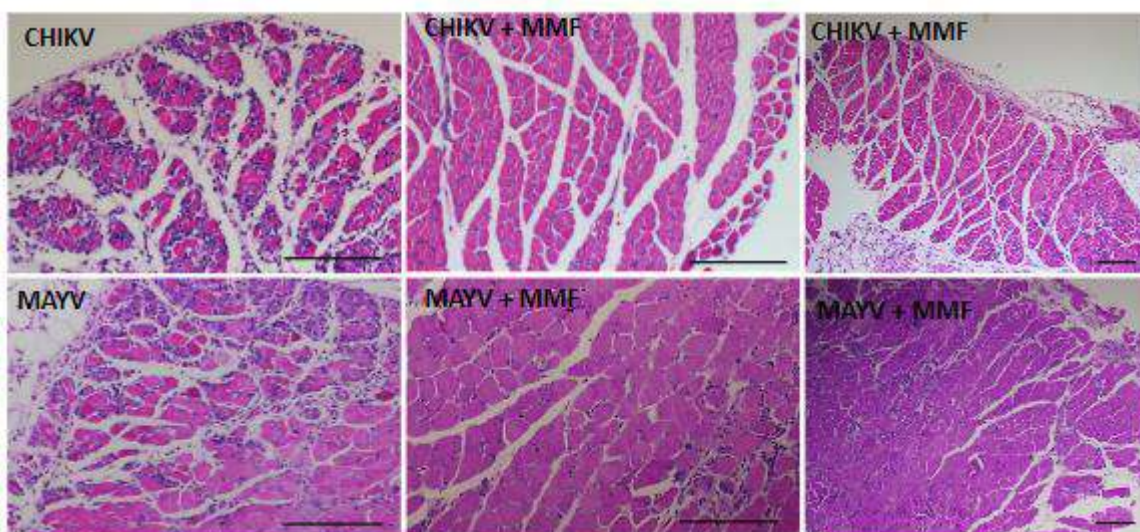


Figura 5. Redução do infiltrado inflamatório e da lesão nas fibras musculares causadas pelo CHIKV e MAYV 8dpi com o tratamento do MMF. Análise histológica do gastrocnêmio esquerdo corado com H&E (barras de escala de figuras = 100 μ m) (Oliveira, Figueiredo, *et al*, 2024).

2. JUSTIFICATIVA

O desbalanço entre produção de ROS e a resposta antioxidante do organismo resulta em estresse oxidativo, uma condição associada a danos celulares e lesões exacerbadas. Durante infecções virais, incluindo aquelas causadas por Alfavírus como CHIKV e MAYV, as ROS desempenham um papel duplo: atuam na defesa inicial contra o vírus, mas, em excesso, causa a pela exacerbação da patogênese e das lesões teciduais (Sadasivam, Kim, *et al.*, 2022; Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024). A ativação da via antioxidante regulada pela NRF2 tem sido proposta como uma abordagem terapêutica promissora. A NRF2, um fator de transcrição que regula a expressão de enzimas antioxidantes e ajuda a restaurar o equilíbrio redox pode levar a proteção de células do hospedeiro, reduzir a gravidade dos sintomas e limitar o impacto do EO durante infecções virais (Foo, Bellot, *et al.*, 2022). Além disso, estudos indicam que a ativação da via NRF pode ter impacto na replicação viral e na modulação do microambiente inflamatório (Camini, Silva, *et al.*, 2017; Jaganjac, M., Milkovic, *et al.*, 2022; Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024).

Pesquisas recentes do grupo mostraram que a replicação de CHIKV e MAYV no músculo esquelético resulta em inflamação, necrose e atrofia persistente das fibras musculares, associada ao aumento da expressão de Murf-1 e Atrogin (enzimas associadas a degradação proteica via ubiquitina-proteassoma) e persistência viral. A atrofia muscular tem sido parcialmente reduzida pelo bloqueio de mediadores inflamatórios, como o TNF, diminuindo a intensidade no agravamento das lesões (Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024). Além disso, no estudo também foi mostrado que o tratamento com o MMF em modelos celulares foi eficaz quando administrada antes da infecção, promovendo proteção celular e redução dos danos oxidativos. Esses resultados reforçam o potencial do tratamento preventivo baseado no uso do MMF para mitigar os impactos da infecção por alfavírus, tanto nas fases agudas quanto pós-agudas (Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024).

Diante disso, uma investigação de moduladores da resposta antioxidante é crucial para a compreensão do impacto do EO na patogênese das infecções por CHIKV e MAYV. Além disso, essa estratégia pode ser aplicável a outros vírus, contribuindo para o desenvolvimento de tratamentos comuns e mais eficazes contra doenças virais. O presente estudo busca não apenas identificar terapias eficazes para os alfavírus artritogênicos, mas também ampliar o entendimento sobre o papel das vias antioxidantes durante o curso da infecção. Essa abordagem pode ajudar a conter os danos celulares, reduzir complicações a longo prazo e melhorar o manejo clínico de pacientes infectados por CHIKV e MAYV.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a ativação da resposta antioxidante no músculo e avaliar o impacto do tratamento com o Monometil fumarato (MMF) nas infecções pelos vírus Chikungunya e o vírus Mayaro.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar se a infecção por alfavírus artritogênicos promove a indução da resposta antioxidante no músculo de camundongos infectados.
- Investigar o impacto do tratamento com MMF sobre a sobrevivência de mioblastos e miotubos murinos infectadas com CHIKV e MAYV.
- Avaliar o impacto do tratamento com MMF sobre a replicação do CHIKV e MAYV em células musculares esqueléticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelo experimental *in vivo*

A fim de avaliar a ativação das vias de resposta antioxidante durante a infecção por Alfavírus *in vivo*, camundongos selvagens (WT) SV129 jovens, com aproximadamente 12 dias de vida e peso médio de 6g, foram infectados com CHIKV e MAYV, subcutaneamente na almofada da pata traseira esquerda com 10^5 PFU, com volume total de 20µL. Como controle, os animais foram inoculados com o mesmo volume de meio de cultura de células não infectadas (Mock). Cada grupo experimental foi alojado junto à mãe não infectada, em gaiolas de polipropileno com livre acesso a ração e água. Os animais foram acompanhados diariamente, e receberam pontuações de acordo com a sintomatologia que cada um apresentava, e o peso e a área da pata (determinada pela largura-altura da região onde houve a infecção com auxílio de um paquímetro digital) também foram medidos. Os animais foram eutanasiados em 4 dpi e 8 dpi, as amostras de tecido (músculos, fígado, coração, joelhos, patas, baço, cérebro, sangue) foram coletadas e armazenadas à -80°C até serem processadas.

4.2. Comitê de ética para análise experimental *in vivo*

Todos os procedimentos experimentais realizados *in vivo* neste trabalho estão de acordo com as regulamentações vigentes sobre a ética e experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, protocolo nº118/24.

4.3. Análise da expressão de enzimas antioxidantes

A quantificação da expressão de citocinas foi realizada por qPCR em tempo real do músculo quadríceps dos animais eutanasiados em 4 e 8 dpi. Os tecidos coletados foram homogeneizados em meio de cultura DMEM na proporção 1:2 com homogeneizador de tecido a 5.000 rpm e o RNA total extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen™), seguindo o protocolo de fabricante. O RNA total extraído foi ressuspensionado em 20µL água DEPC e quantificado em um NanoDrop, utilizando 2 µg de RNA para reação de transcrição reversa, através do Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (AppliedBiosystems™), seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. Após a obtenção do cDNA das amostras estas foram submetidas a qPCR usando Power SYBR Green Master Mix (AppliedBiosystems™).

As reações foram realizadas utilizando iniciadores específicos para os seguintes genes murinos: Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (Gapdh) (direto: 5'- AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG - 3'; reverso: 5'- TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA -3'); Glutational peroxidase (GPx) (direto: 5'- GGT GGT GCT CGG TTT CCC GT -3', reverso: 5'- AAT TGG GCT CGA ACC CGC CAC -3'); Glutational redutase (GSR) (direto: 5'- GGG ATG CCT ATG TGA GCC CGG -3', reverso: 5'- TGA CTT CCA CCG TGG GCC GA -3'); Glutamato cisteína ligase (GCL) (direto: 5'- CGG AGG AAC GAT GTC TGA GT -3', reverso: 5'- CTG GGG AAT GAA GTG ATG GT -3'); Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) (direto: 5'- GGC TGC GAG CAA AAT AG -3'; reverso: 5'- TTC TCT GGC CGA TTC AGA G -3'); Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (Gapdh) (direto: 5'- TGA CCT CAA CTA CAT GGT CTA CA -3', reverso: 5'- ACA TCT GGT ACA TCA ACT CCA GT -3'); Fator induzido por Hipóxia-1 alfa (HIF-1 alfa) (direto: 5'- CAC CGA TTC GCC ATG GA -3', reverso: 5'- TTT CTT TTC GAC GTT CAG AAC TCA T -3'); Hemeoxigenase-1 (HO-1) (direto: 5'- GCC GAG AAT GCT GAG TTC ATG -3', reverso: 5' - TGG TAC AAAG GAA GCC ATC ACC -3'); Superóxido dismutase (SOD2) (direto: 5'- AAG GTC GCT TAC AGA TTG CTG C -3', reverso: 5'- AGC GGA ATA AGG CCT GTT GTT -3').

4.4. Propagação de estoques virais

Para a produção do estoque de CHIKV e MAYV, utilizamos a linhagem celular C636, são células isoladas de larva de um mosquito *Aedes albopictus* (C6/36), elas foram cultivadas em monocamada com meio de cultura L-15 Medium (Leibovitz) (L-15; Sigma-Aldrich), suplementada com 10% de SFB (SFB; Gibco®), 1% de aminoácidos essenciais e L-Glutamina e mantidas em frascos de cultura médios (75cm²) e em incubadora a 28°C. Com 80 – 90% de confluência celular, os frascos de cultura foram infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 do respectivo vírus em meio L-15 por 1 hora em estufa a 28°C. Após esse período de adsorção, o meio é descartado e as células são mantidas em meio L-15 com 5% SFB, e 72 horas após a infecção (hpi) o sobrenadante das células infectadas é centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante contendo o vírus é então coletado e armazenado a -80°C. Paralelamente, o título viral do sobrenadante é determinado por ensaio de formação de placas de lise.

4.5. Linhagem de células musculares esqueléticas

Células derivadas de mioblastos murinos (C2C12) (CRL-1772™; linhagem obtida do American Type Culture Collection – ATCC) foram cultivadas em monocamada com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco®) com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®), e mantidas em frasco de cultura médios (75 cm²) em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Para os ensaios mioblastos murinos, células C2C12 foram plaqueadas usando 6×10^5 células em placas de 48 poços, e cultivadas em meio DMEM high suplementado com 10% SFB e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

E para a diferenciação de mioblastos para miotubos, as células C2C12, foram plaqueadas usando $1,2 \times 10^6$ células em placa 48 poços, cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas de plaqueamento, a cultura é mantida em DMEM com suplementação de soro de cavalo (SC; Gibco®) a 2% e sendo o meio trocado a cada 3 dias até a observação de uma cultura confluenta diferenciada em fibras, aproximadamente 7 dias após o início da diferenciação.

4.6. Replicação e tratamento em C2C12

Para os ensaios de tratamento pré-infecção, células C2C12 após atingirem confluência de 90 a 95% são tratadas com o MMF solubilizado em Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) a 0 µM, 20 µM, 50 µM ou 100 µM. Após 4h essas células foram infectadas com MOI de 1 de CHIKV ou MAYV e colocadas em estufa a 5% de CO₂. A cultura foi monitorada por cerca de 24h e interrompida devido a baixa viabilidade celular evidenciada por microscopia. Alíquotas de 25µL são coletadas após infecção e armazenadas em freezer -80°C, para determinação de partículas formadoras de placas.

Após atingirem confluência de 90 a 95% as células C2C12 foram infectadas com MOI de 1 de CHIKV ou MAYV e são colocadas em estufa a 5% de CO₂. Após 1h de adsorção viral, o meio foi removido, e foi adicionado meio DMEM suplementado de SFB a 2% e com o MMF a 0 µM, 20 µM, 50 µM ou 100 µM de MMF. A cultura foi monitorada por cerca de 24h e interrompida devido à baixa viabilidade celular evidenciada por microscopia. Alíquotas de 25µL foram coletadas após infecção e armazenadas em freezer -80°C, para determinação de partículas formadoras de placas.

4.7. Quantificação viral por ensaio de placa de lise

Os títulos virais dos estoques e das amostras celulares, foram determinados por ensaio de formação de placas de lise em células de rim de macaco verde (VERO) (CCL-81™; linhagem celular obtida do American Type Culture Collection – ATCC). As amostras de células foram diluídas em uma diluição seriada em DMEM. Em seguida, cada diluição foi utilizada para infectar células VERO confluentes, semeadas em monocamada em placas de 24 poços. Após 1h e 30 min de adsorção, 1 ml de carboximetilcelulose a 1,5% (Sigma-Aldrich) em DMEM (concentrado em 2x) com 1% de SFB e 1% de antibiótico (Penicilina – Streptomicina), foi adicionada às células e incubadas a 37°C por 48h. Após esse tempo as células foram fixadas com formaldeído a 10% e as placas de lise foram visualizadas após coloração com cristal violeta a 1% em etanol a 20%. O título foi calculado como unidades formadoras de placa por ml (PFU/ml).

4.8. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio; Life Technologies). Esse ensaio tem como principal função quantificar a atividade metabólica das células, através da redução do MTT, por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica em cristais de formazan de cor azul púrpura, que se acumulam no citoplasma celular. Esses cristais são extraídos e diluídos em solventes, como o isopropanol acidificado (0.04M) utilizado neste trabalho.

Para isso, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ pelo tempo de pós infecção de cada experimento. Após esse tempo, o sobrenadante da cultura foi removido e as células incubadas em 250 µL de meio DMEM acrescido com MTT (0,5mg/mL). As células foram deixadas em contato com esta solução por 1h na estufa a 37°C com 5% de CO₂ e abrigado de fontes luminosas.

Após este período de tempo, esse meio com solução MTT é removido e os cristais de formazan foram solubilizados em 200µL de isopropanol com ácido clorídrico. Após homogeneização, foi pipetado 150µL da solução resultante em uma placa de 96 poços. O seu conteúdo foi analisado em espectrofotômetro em uma leitura de 570nm de comprimentos de

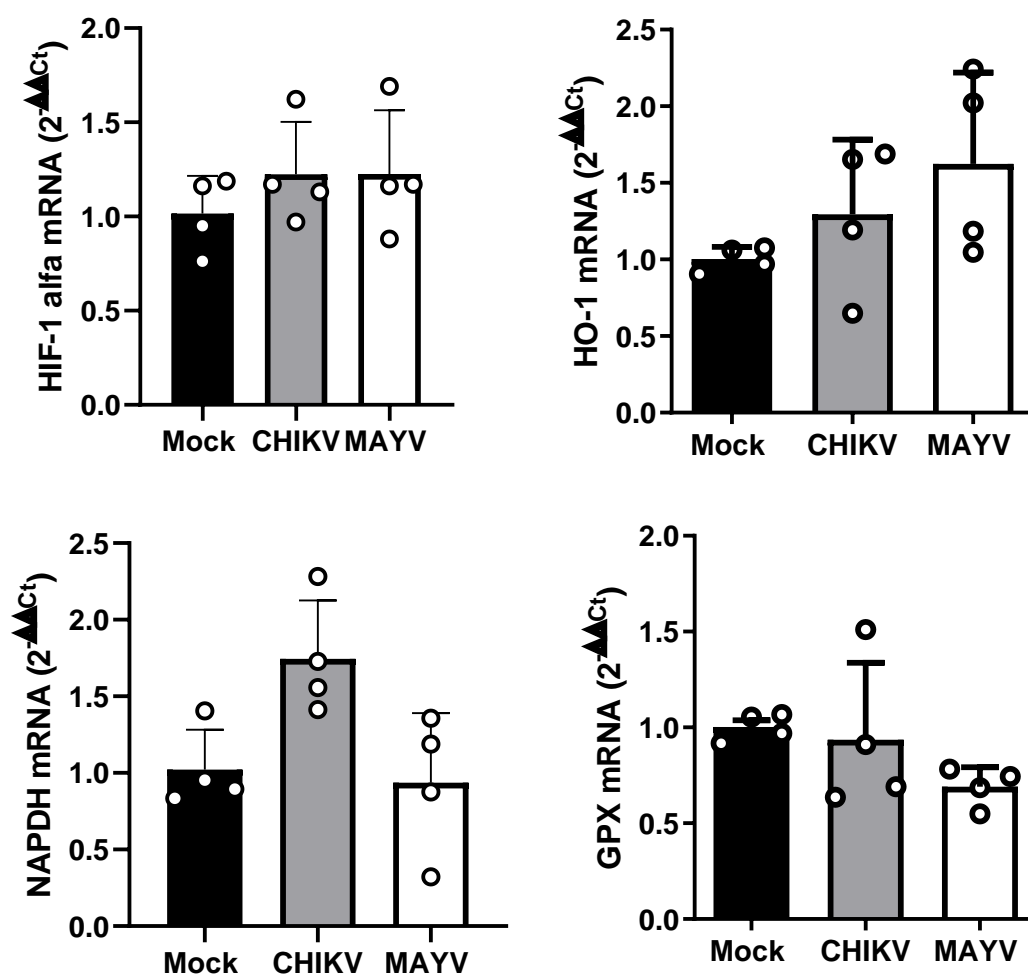
onda. Em seguida, os dados foram plotados no software GraphPadPrism6®, comparando o comprimento de onda dos grupos infectados e tratados com a média dos grupos controle.

5. RESULTADOS

5.1. A infecção em modelos de lesão grave pelo MAYV, mas não pelo CHIKV induz o aumento da expressão de enzimas antioxidantes no tecido muscular.

Para investigar a ativação da resposta antioxidante nas infecções pelo CHIKV e MAYV foi feita a análise das enzimas antioxidantes por qPCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real). Camundongos SV129 WT infectados pela via subcutânea com MAYV e CHIKV tiveram seus músculos gastrocnêmios coletados em 4 dpi, para a análise das enzimas Glutathiona peroxidase (GPX), Heme-oxigenase (HO-1), Glutamato cisteína ligase (GCL), Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) e Fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF-1 alfa). A análise da expressão indica que ao menos em 4 dpi, embora haja lesão tecidual e indução de ROS neste modelo de estudo, não observamos mudanças significativas no nível de transcritos dessas enzimas em relação aos animais controle (Mock) (**Figura 6.**).

4dpi



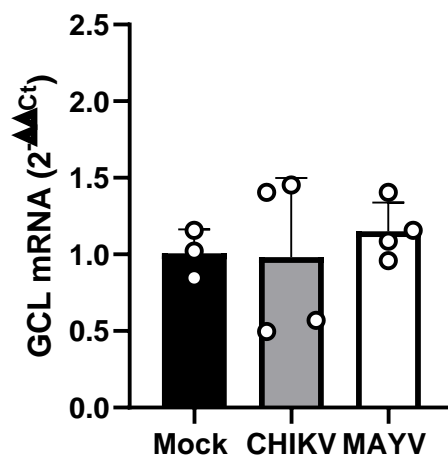


Figura 6. A infecção pelo MAYV e CHIKV não alterou de forma significativa a expressão de enzimas antioxidantes no tecido muscular. Camundongos SV129 do tipo selvagem (WT) de 12 dias após o nascimento foram infectados por via subcutânea com MAYV e CHIKV ou inoculados com MOCK. O gastrocnemius foi dissecado em 4 dpi e a expressão das enzimas GPX, HO-1, GCL, NADPH e HIF-1 alfa foi analisada por PCR em tempo real. A expressão foi analisada em relação ao MOCK e normalizada pela expressão de actina. A análise estatística para a expressão de enzimas antioxidantes foi realizada por ANOVA de uma via.

Buscando avaliar se após a resolução da replicação viral no músculo esquelético há a ativação das enzimas antioxidantes, camundongos infectados tiveram seu músculo gastrocnêmio coletado e analisado em 8dpi. Podemos sugerir uma expressão dessas enzimas da via antioxidante somente na infecção pelo vírus MAYV (**Figura 7.**).

8 dpi

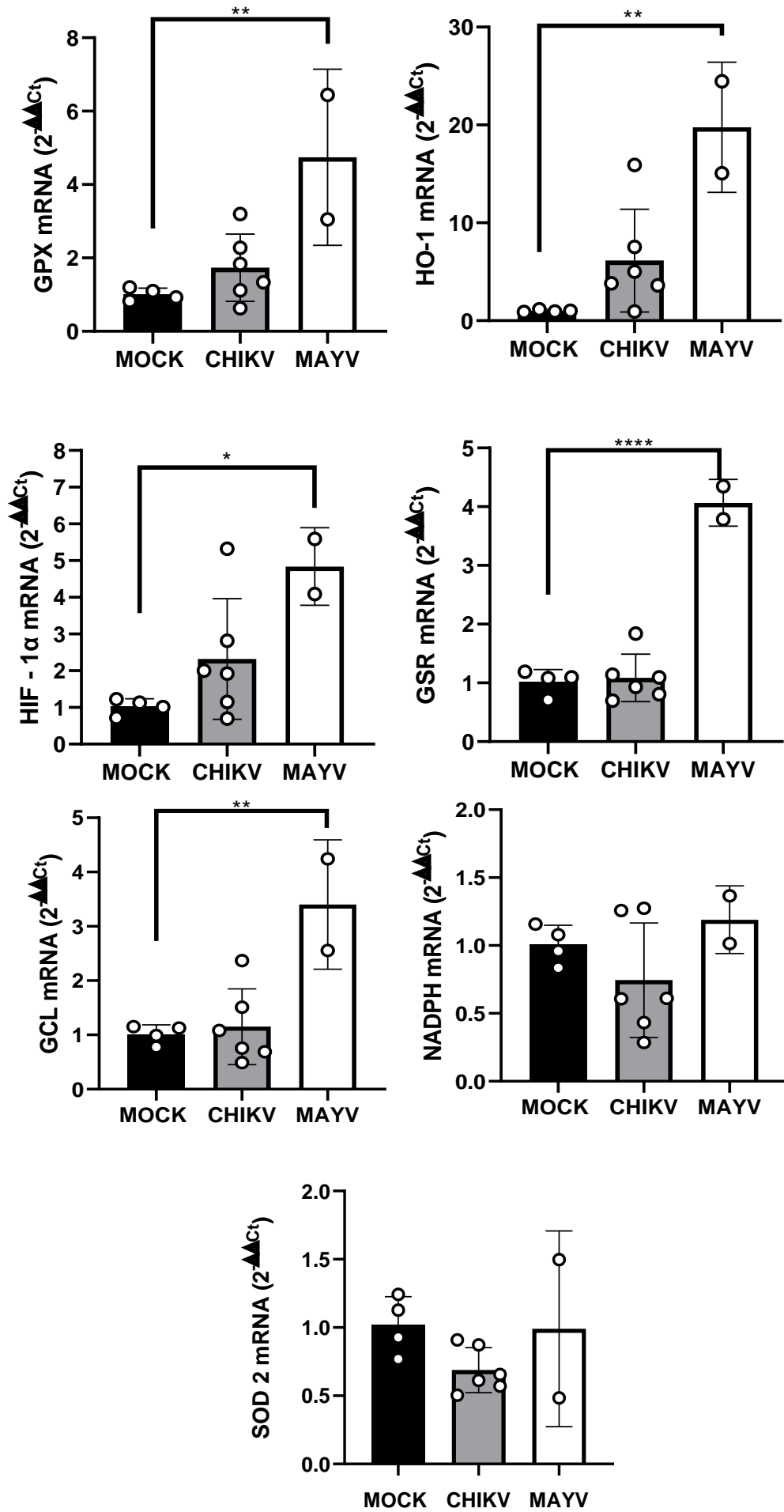


Figura 7. A infecção pelo MAYV sugere uma indução a expressão de enzimas antioxidantes no tecido muscular. Camundongos SV129 WT infectados via subcutânea aos 12 dias de vida com MAYV e CHIKV, foram eutanasiados e coletados seus músculos em 8 dpi. A análise da expressão das enzimas SOD2, HIF-1 alfa, GSR, HO-1, NADPH, GCL e GPX foi feita por PCR em tempo real. A expressão foi analisada em relação ao Mock e normalizada por Gapdh. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via (* $p < 0,05$); (** $p < 0,01$); (**** $p < 0,0001$).

5.2. O MMF apresentou baixa toxicidade em 50 μ M em células da linhagem C2C12

Para a análise do impacto do Monometil Fumarato (MMF) em células musculares, primeiramente buscamos encontrar a concentração não tóxica do MMF. A toxicidade tem como objetivo avaliar a viabilidade das células C2C12 em forma de mioblasto e diferenciadas em miotubos, em tratamento por 24h. Essas células foram cultivadas em placas de 48 poços e tratadas com MMF em diferentes concentrações. Após o tratamento as células ficam em estufa por 24h. Sendo assim, foi possível observar que dentre as diferentes concentrações testadas, a de 50 μ M é a que apresenta menor toxicidade, uma vez que o tratamento com 50 μ M de MMF não resultou em diminuição da viabilidade de células C2C12 em relação ao veículo (Vh), (Figura 8.).

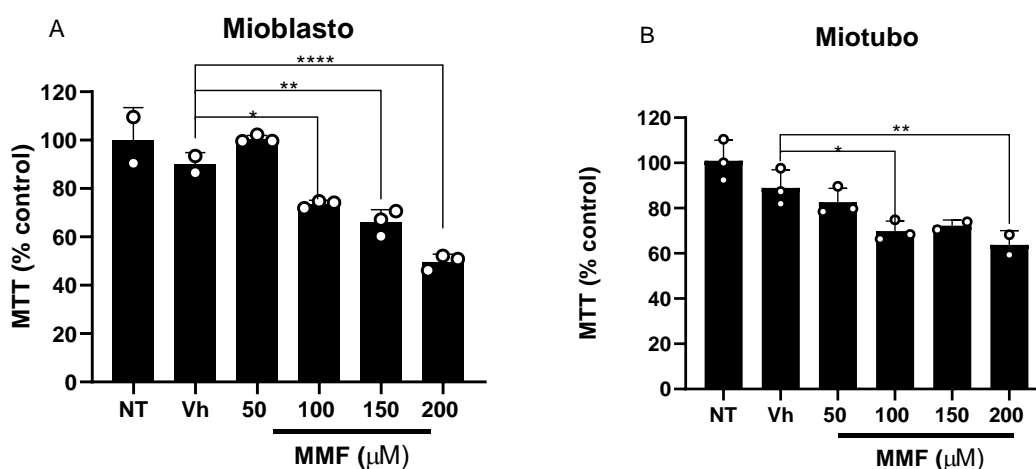


Figura 8. O tratamento pelo MMF em células C2C12 apresenta menor toxicidade na concentração de 50 μ M.

(A) Células de mioblasto murino tratadas por 24h com MMF. (B) Células de mioblastos murino diferenciadas em miotubos tratadas por 24h com MMF. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via (* $p < 0,05$); (** $p < 0,01$); (*** $p < 0,001$) (**** $p < 0,0001$).

5.3. O tratamento com MMF reduz a morte celular de mioblastos e miotubos, sem alteração na replicação viral

Para observar o efeito do tratamento com o MMF, células C2C2 diferenciadas em miotubos foram tratadas 4h antes da infecção pelos CHIKV e MAYV. Após infectadas foram cultivadas em estufa de CO₂ até 20 horas após infecção (hpi). Em seguida foi feita a análise da viabilidade celular da C2C12 por MTT. Foi possível observar que com o tratamento pré-infecção houve um aumento da atividade mitocondrial com o tratamento no grupo infectado pelo MAYV com concentrações de 50µM e de 100µM. Podemos observar que ao tratar a célula C2C12 com o MMF antes da infecção, tem uma melhora na viabilidade celular (**Figura 9**).

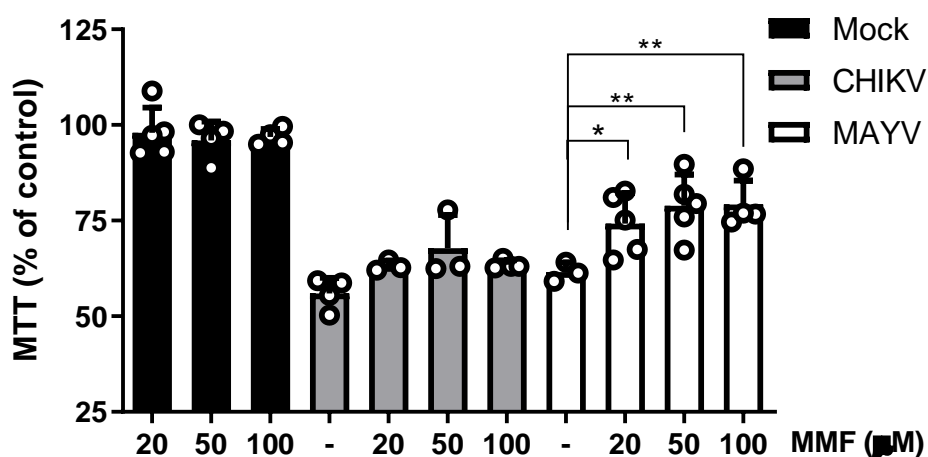
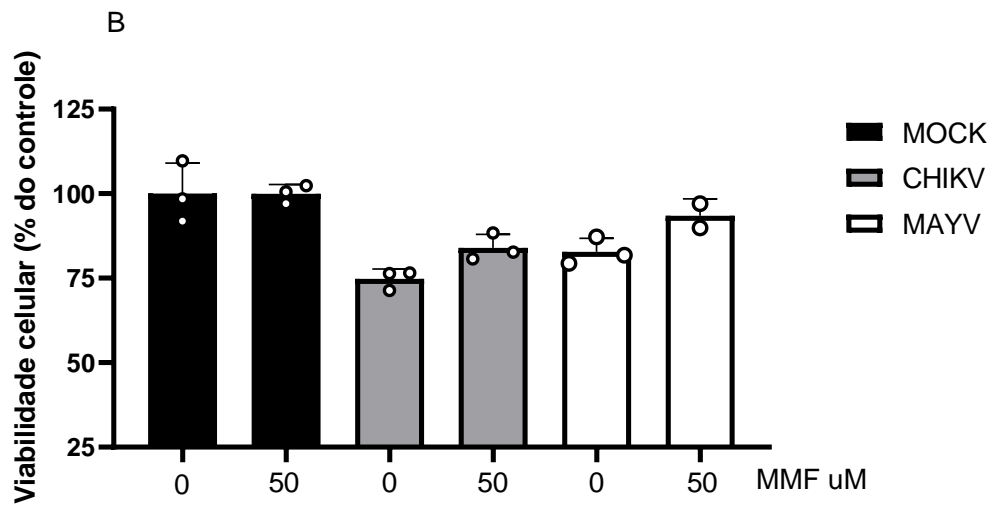
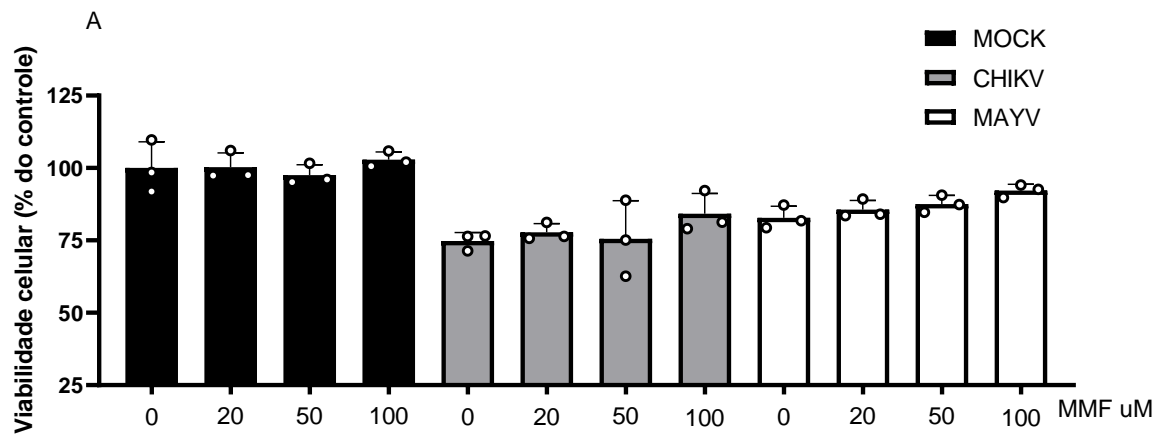


Figura 9. O impacto do pré tratamento na replicação de alfavírus em células musculares. Células C2C12, diferenciadas em miotubos, tratadas 4 horas antes da infecção com diferentes concentrações do composto MMF, apresentou uma melhora no quadro da infecção pelo MAYV. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via (* $p < 0,05$); (** $p < 0,01$).

Ao visualizar que o tratamento pré-infecção melhora a viabilidade celular, buscamos ver se o tratamento pós-infecção também funcionaria. Então, após infectar as células C2C12 com CHIKV e MAYV, deixar as células em estufa de CO₂ pelo tempo de adsorção viral, e tratar as células em diferentes concentrações do MMF, foi observado que os Miotubos ao serem tratados somente após infecção não mostraram diferenças em relação ao grupo Veículo (**Figura 10**). E quando tratados Pré e Pós infecção também não há melhora na infecção pelos alfavírus. Ao avaliar a replicação viral por ensaio de placas de lise não vemos uma diferença na quantidade de partículas formadoras de placas (PFU) por ml de amostra (**Figura 11**).



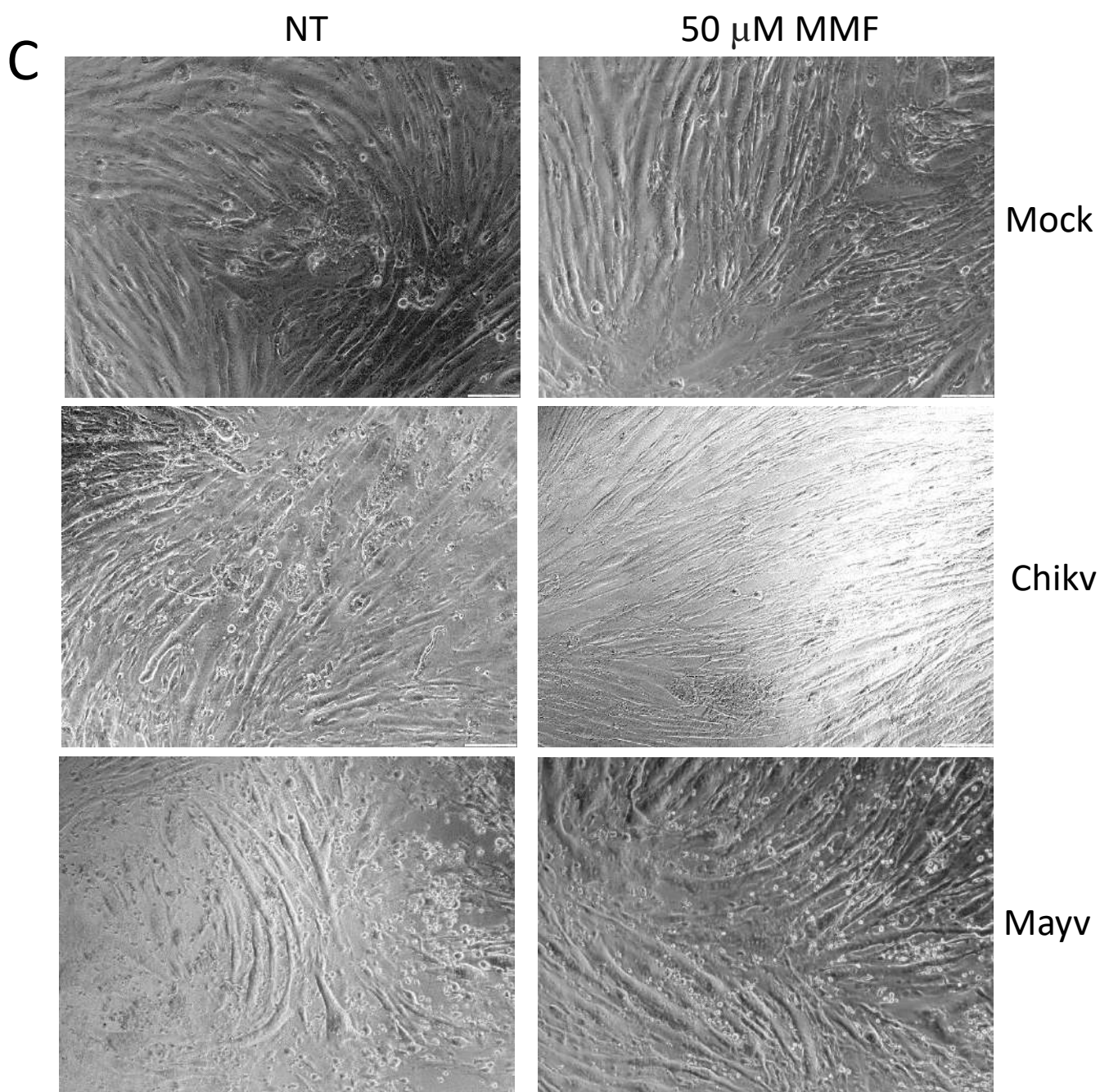


Figura 10. O tratamento com MMF pós infecção e pré e pós infecção com diferentes concentrações na sobrevivência de miotubos. Células C2C12 diferenciadas em miotubos foram tratadas pré adsorção e pós adsorção das partículas virais. (A) Viabilidade celular dos miotubos com o tratamento Pós infecção com diferentes concentrações. (B) Viabilidade celular dos miotubos com tratamento Pré e Pos infecção com concentração de 50 μ M. (D) Células C2C12 diferenciadas, Mock ou infectadas tratadas com 50 μ M de MMF, imagem em campo claro. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via (* $p < 0,05$); (** $p < 0,01$); (**** $p < 0,0001$).

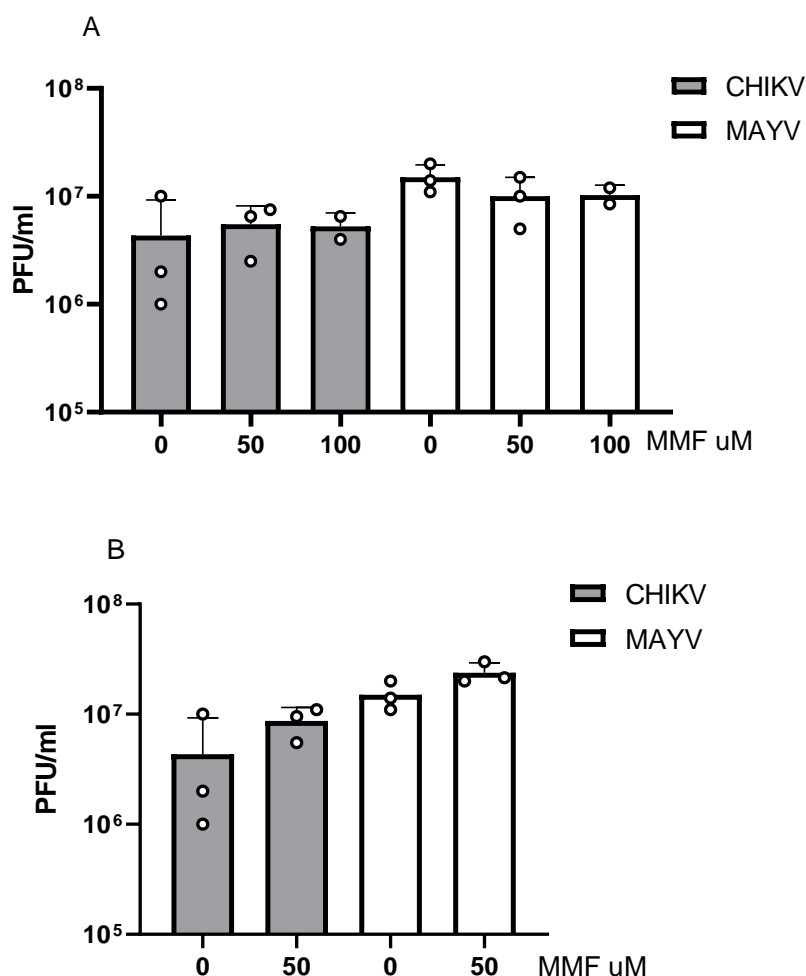
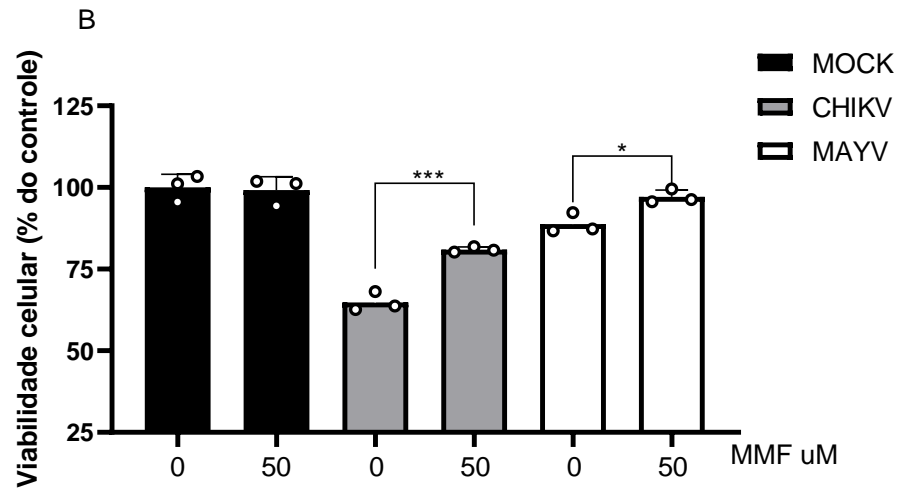
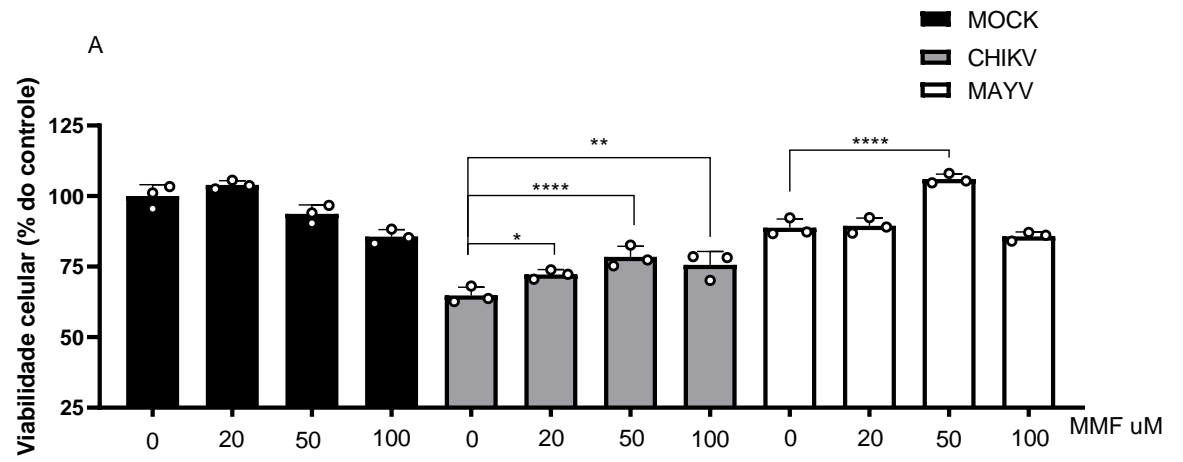


Figura 11. Replicação viral do sobrenadante das células tratadas com MMF pós infecção e pré e pós infecção com diferentes concentrações na sobrevivência de miotubos. (A) Carga viral do sobrenadante das células infectadas por MAYV e CHIKV tratados pós infecção e com diferentes concentrações do MMF (B) Carga viral do sobrenadante das células infectadas por MAYV e CHIKV tratadas Pré e Pós infecção com concentração de 50 μ M do MMF

Nós também avaliamos o efeito do tratamento em células C2C12 não diferenciadas infectadas por CHIKV e MAYV, sendo tratadas nos tempos pós adsorção e pré-pós adsorção viral. Nessas células foram observadas diferenças na infecção pelo CHIKV em todas as concentrações no tempo de tratamento pós-adsorção, e para o MAYV somente em 50 μ M houve a melhora na viabilidade celular. E no tratamento pré e pós adsorção os dois vírus apresentaram melhora na viabilidade celular em 50 μ M (**Figura 12.**). A quantificação viral do sobrenadante não mostrou variação em nenhum dos dois vírus com o tratamento com o MMF (**Figura 13.**).



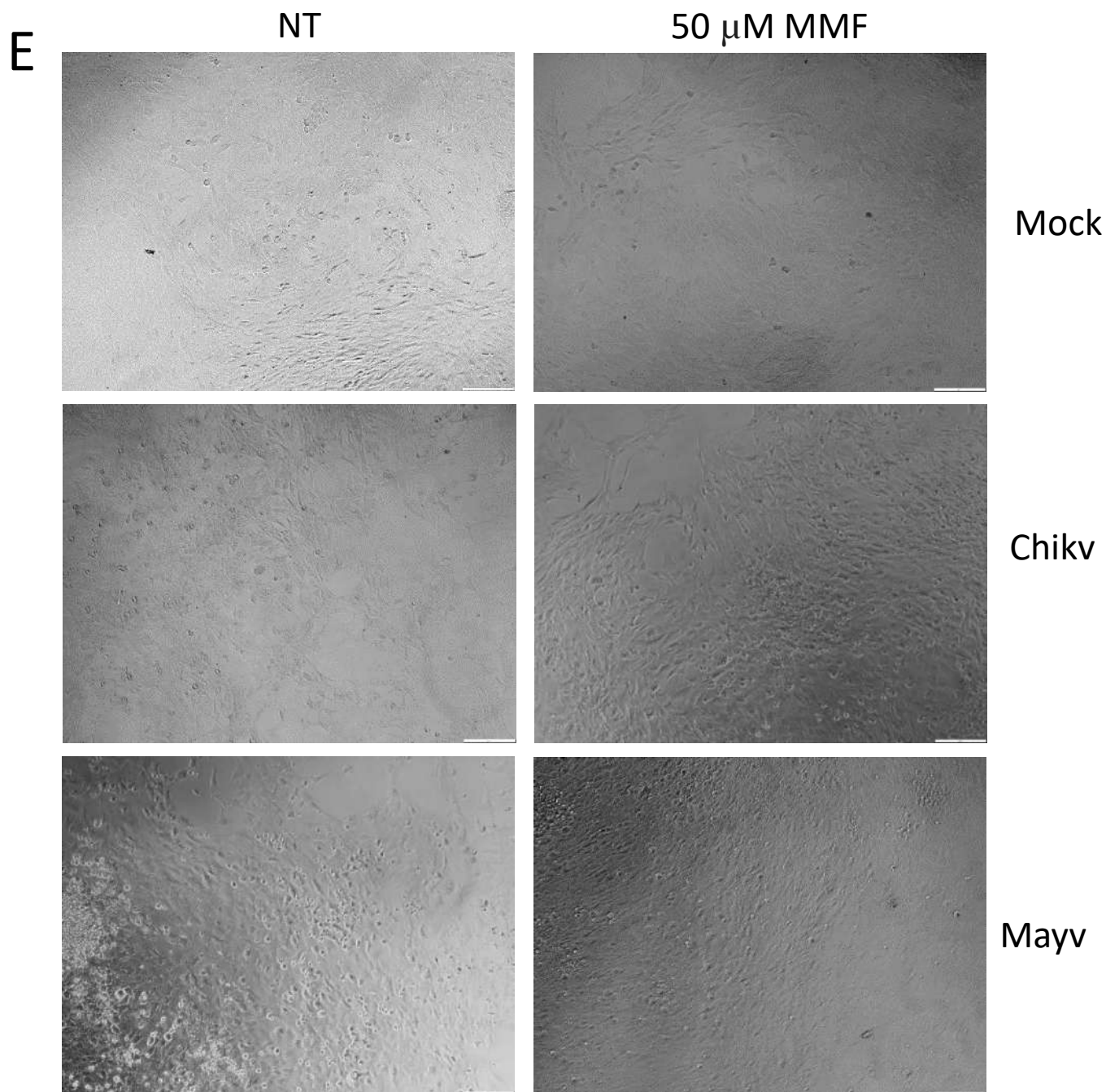


Figura 12. O tratamento com MMF pós infecção e pré e pós infecção com diferentes concentrações na sobrevivência de mioblastos. (A) Viabilidade celular dos mioblastos com o tratamento Pós infecção com diferentes concentrações. (B) Viabilidade celular dos mioblastos com tratamento Pré e Pos infecção em diferentes tempos e com concentração de 50 μ M. (D) Células C2C12 não diferenciadas, Mock ou infectadas tratadas com 50 μ M de MMF, imagem em campo claro. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via (* $p < 0,05$); (** $p < 0,01$); (*** $p < 0,0001$).

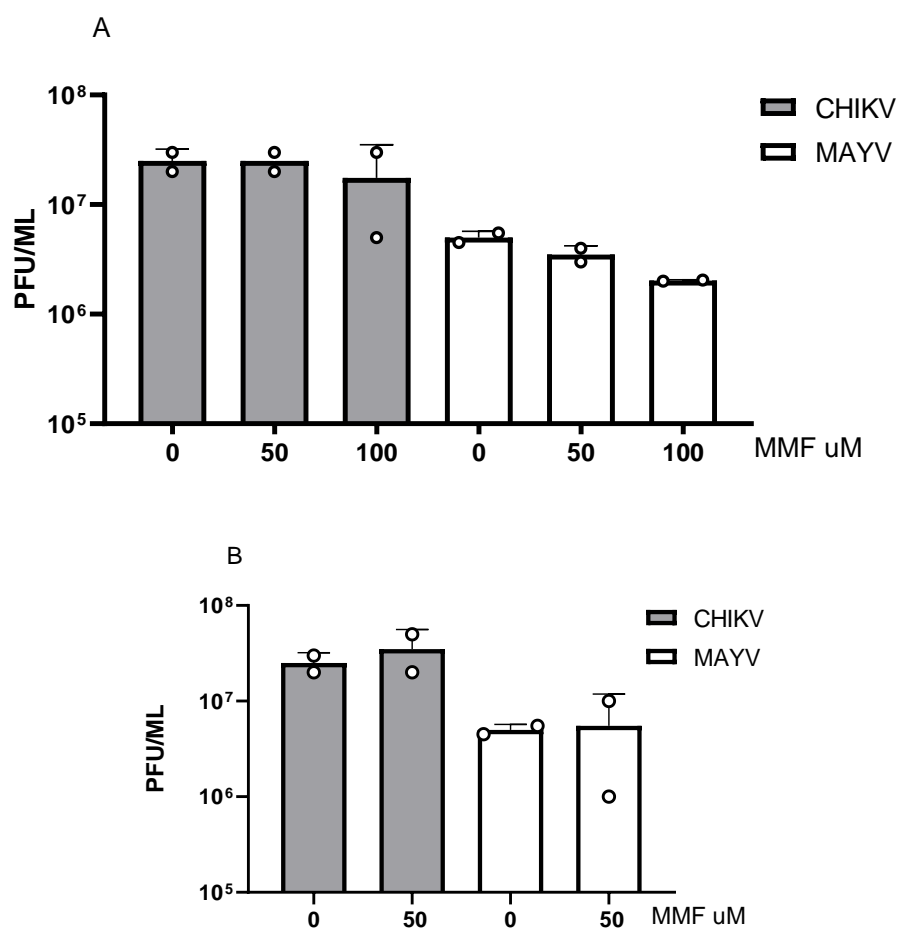


Figura 13. Replicação viral do sobrenadante dos mioblastos tratados com MMF pós infecção e pré e pós infecção com diferentes concentrações. (A) Carga viral do sobrenadante das células infectadas por MAYV e CHIKV tratados pós infecção e com diferentes concentrações do MMF (B) Carga viral do sobrenadante das células infectadas por MAYV e CHIKV tratadas Pré e Pós infecção com diferentes concentrações do MMF.

6. DISCUSSÃO

A indução da produção de ROS na infecção por alfavírus artritogênicos tem sido demonstrado em diversos modelos experimentais *in vitro*, com células HepG2 (células tumorais hepáticas humanas), J774 (linhagem de macrófagos murinos) e RAW264.7 (linhagem de macrófagos leucêmicos murinos) e células endoteliais (Camini, Caetano, *et al.*, 2017; Cavalheiro, Silva, *et al.*, 2016; Teles, Souza, *et al.*, 2024). A indução de ROS na infecção por esses vírus também foi evidenciada no fígado e no músculo no curso da infecção em modelos *in vivo* (Caetano, Camini, *et al.*, 2019; Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024). Esses achados indicam que os Alfavírus Artritogênicos, como o CHIKV e o MAYV, são indutores de um desbalanço no estado redox do organismo infectado. Apesar disso, nossos dados demonstram que as enzimas antioxidantes não são induzidas à expressão durante a fase inicial da infecção por MAYV e CHIKV. Essa ausência da ativação dessas enzimas pode contribuir para o aumento de ROS e lesão tecidual evidenciado neste modelo de infecção (Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024).

Apenas na fase pós aguda, o MAYV induziu a ativação das vias antioxidantes indicada pelo aumento da expressão das enzimas HIF-1 alfa, GSR, HO-1, GCL e GPX, sugerindo um ativação tardia desta resposta, o que pode estar associada às diferenças nos mecanismos de patogenicidade entre CHIKV e MAYV, e podem refletir na gravidade e persistência dos sintomas em ambas infecções, tornando-se alvo para estudos futuros.

O NRF2, um fator de transcrição central para a defesa antioxidante, regula a expressão de diversas enzimas protetoras. Em condições normais, NRF2 é inativo ao se ligar a KEAP1 (proteína 1 associada à ECH semelhante a Kelch) sendo ubiquitinada e degradada pela via proteassoma. No entanto, sob estresse oxidativo KEAP1 é oxidado, permitindo que a NRF2 se transloque para o núcleo celular e se ligue a elementos ativos de resposta antioxidante (ARE), promovendo a expressão de enzimas como GPX, HO-1, GCL, NADPH e HIF-1 alfa. (Kasai, Shimizu, *et al.*, 2020). Estudos anteriores já provaram que a modulação da NRF2 pode trazer melhora no quadro de infecções virais. Em infecções pelo SARS-CoV-2 a ativação farmacológica da NRF2 levou à proteção celular, a promoção do fenótipo anti-inflamatório durante a ativação de macrófagos, prevenindo a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e piroptose, e a inibição da propagação viral (Cuadrado, Pajares, *et al.*, 2020). O Bardoxolona metil (BM) inibiu a infecção pelo vírus da raiva via ativação da NRF2, promovendo uma resposta protetora em células da linhagem Neuro2a (N2a), principal célula-alvo do vírus da raiva. Além desses, o Fumarato de dimetila que tem como metabólito ativo o

MMF, inibe a proliferação e influência na apoptose de células infectadas pelo HTLV-1 (vírus da leucemia de células T humanas tipo 1), além de inibir o NF- κ B (fator nuclear Kappa B) (Sato, Maeta, *et al.*, 2023). E o estudo do nosso laboratório mostrou que o MMF reduz a atrofia e a replicação viral em camundongos infectados por CHIKV e MAYV ao estabilizar e ativar o NRF2, induzindo a expressão de genes de enzimas antioxidantes (Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024). No presente estudo a falta da resposta antioxidante durante a fase aguda da infecção pelos Alfavírus artritogênicos e consequentemente a manutenção do desbalanço redox pode estar relacionada a inflamação persistente e a manutenção dos sintomas corroboram essas evidências. Dados *in vivo* mostram que o estresse oxidativo, além de dificultar a regeneração muscular, amplia a gravidade das infecções ao inibir ou não estimular a resposta antioxidante natural do hospedeiro. Essa característica exacerba os efeitos deletérios da infecção e impacta os níveis do processo de recuperação celular (Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024).

Nesse contexto, o tratamento pelo MMF levando a uma melhora na estrutura muscular de camundongos em 8 dpi e a redução dos níveis dos mediadores do processo de atrofia, indicam que a indução de um ambiente antioxidante pode contribuir para a redução dos danos induzidos pela infecção dos Alfavírus artritogênicos (Oliveira, Figueiredo, *et al.*, 2024). Os achados desse estudo, que demonstram que o tratamento de células musculares com MMF influencia na sobrevivência de células musculares murinas infectadas, mesmo sem a redução da replicação e produção viral, que corroboram com essa hipótese. Tal proteção reforça a importância de explorar estratégias antioxidantes para mitigar os efeitos da infecção sem depender exclusivamente de agentes antivirais. A ausência de interferência na replicação viral ressalta que seu efeito protetor está relacionado à modulação da resposta celular, e não a uma ação antiviral direta. Esses achados são positivos para o entendimento dos mecanismos de proteção celular durante infecções por Alfavírus artritogênicos e apontam o MMF como uma abordagem promissora para atenuar os danos celulares.

Estudos com silimarina, um fitoterápico hepatoprotetor, diminui a produção de ROS em células de hepatócitos humanos infectadas pelo MAYV. O tratamento com silimarina foi capaz de diminuir os níveis de malondialdeído (MDA) e de proteína carboxiladas, demonstrando uma redução no estresse oxidativo, e melhorar a sobrevivência celular (Camini, Silva, *et al.*, 2018). Com base nessas evidências, fica claro que a produção de ROS e que o estresse oxidativo representa importante mecanismo de patogenicidade do MAYV, a intervenção por abordagens antioxidantes se mostra potencialmente eficaz. Em outros estudos foi revelado que a produção de ROS, além de seu envolvimento na sobrevivência celular, pode ser um estímulo para a

secreção de TNF na infecção pelo MAYV em macrófagos (Cavalheiro, Silva, *et al.*, 2016). A redução de ROS por agentes antioxidantes, por exemplo, diminui a produção de TNF em macrófagos. Isso evidencia que a produção de ROS podem também medeia a ativação da inflamação durante a infecção pelo MAYV, agravando as lesões.

Os resultados desse estudo também indicam que abordagens terapêuticas focadas em mitigar os efeitos secundários das infecções por alfavírus artrítogênicos, como o estresse oxidativo, podem ser importantes para infecções que ainda não apresentam antivirais específicos. A capacidade do MMF de criar um ambiente antioxidante sugere que outros moduladores da via NRF2 também possam ser explorados como alternativas terapêuticas, ampliando as possibilidades para o manejo clínico de doenças associadas ao estresse oxidativo e à inflamação crônica (Timpani, Rybalka, 2020; Kaiser, Baniasadi, *et al.*, 2021; Pang, Jiang, *et al.*, 2021). Embora o MMF se mostra promissor na redução da lesão celular em infecções por alfavírus artrítogênicos, estudos adicionais são necessários para a compreensão completa de sua ação durante a infecção, investigar os mecanismos de ação do MMF, explorar condições experimentais que possam potencializar o seu efeito protetor, bem como, avaliar outros mediadores antioxidantes na resposta ao estresse oxidativo induzido por esses vírus e que possam reduzir os efeitos crônicos da infecção.

7. CONCLUSÕES

- A infecção pelo CHIKV ou MAYV, não induzem a expressão de enzimas antioxidantes em resposta à infecção por alfavírus artrítogênicos na fase de estabelecimento da infecção em modelo de lesão grave;
- A infecção pelo MAYV, diferentemente do CHIKV, induz ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes em fases mais tardias da infecção;
- O tratamento com o Monometil fumarato (MMF) mostrou-se seguro para células C2C12 em concentrações de até 50 μ M, enquanto as concentrações mais altas foram prejudiciais às células;
- Os diferentes regimes de tratamento com MMF foram eficientes na prevenção da morte celular em mioblastos e miotubos infectados por CHIKV ou MAYV, destacando seu papel protetor durante a infecção;
- O tratamentos com MMF não impactam na carga viral *in vitro*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., *et al.*, "Mayaro: an emerging viral threat?", **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 26 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6156602/>. Acesso em: 13 novembro. 2024.
- Almeida, L.T., Ferraz, A.C., Carla, C., *et al.* "Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo", **Virus Research**, v. 286, p. 198084–198084, 2 jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198084>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170220300332?via%3Dihub>. Acesso em: 9 dez. 2024.
- Ana Paula Rozal Dalvi [S.I: s.n.], [S.d.]. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/47634/ana_paula_dalvi_ensp_dout_2020.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em: 9 set. 2024.
- Andreolla, A.P., Borges, A.A., Bordignon, J., *et al.*, "Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development", **Viruses**, v. 14, n. 8, p. 1787–1787, 16 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14081787>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9415492/>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- Auguste, A.J., Liria, J., Forrester, N.L., *et al.* "Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010", *Emerging infectious diseases*, v. 21, n. 10, p. 1742–1750, 24 ago. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2110.141660>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4593426/>. Acesso em: 6 dez. 2024.
- Azar, S. R., Campos, R. K., Bergreen, N. A., *et al.* "Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks", v.8, n.8, p.1167–1167, 1 de agosto de 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081167>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7464724/>. Acesso em: 30 de setembro de 2024
- Bai, R., Guo, J., Ye, X.Y., *et al.* "Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease", **Ageing Research Reviews**, v. 77, p. 101619–101619, 5 abr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101619>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163722000617?via%3Dihub>. Acesso em: 8 dez. 2024.
- Baxter, V.K., Heise, M.T., "Immunopathogenesis of alphaviruses", **Advances in virus research**, p. 315–382, 1 jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.06.002>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8224468/>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- Beesoon, S., Funkhouser, E., Kotea, N., *et al.*, "Chikungunya Fever, Mauritius, 2006", *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 2, p. 337–338, 1 fev. 2008. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1402.071024>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2630048/>. Acesso em: 11 out. 2024.
- Blettery, M., Brunier, L., Polomat, K., *et al.* "Brief Report: Management of Chronic Post-Chikungunya Rheumatic Disease: The Martinican Experience", **Arthritis & Rheumatology**, v. 68, n. 11, p. 2817–2824, 6 jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.39775>. Disponível em: <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.39775>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- Caetano, C.C. da S., Camini, F.C., Almeida, L.T., *et al.*, "Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress is Associated With Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model", **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 25 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51713-9>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6814867/>. Acesso em: 14 out. 2024.
- CAMINI, F. C., CARLA, C., ALMEIDA, L. T., *et al.* "Oxidative stress in Mayaro virus infection", **Virus Research**, v. 236, p. 1–8, 25 abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170216307122?via%3Dihub#sec0055>. Acesso em: 29 out. 2024.
- Camini, F.C., Silva, C.F., Silva, C.C., *et al.* "Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress", **Antiviral Research**, v. 158, p. 8–12, out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.023>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016635421830175X?via=ihub#kwrds0010>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Costa-da Silva, A.L., Ioshino, R.S., Petersen, V., *et al.* "First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005630, 14 jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005630>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5470658/>. Acesso em: 1 dez. 2024.

Cavalcante, T.Y.V.L., Pereira, M.R., Paula, S.O., *et al.* "A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development", **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 969–969,5 maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14050969>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9147731/>. Acesso em: 15 out. 2024.

Cavalheiro, M. G., Silva, L., Campos, H. S., *et al.* "Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication", **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1485–1499, 1 set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150685>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/8d8ZvXMPWhFWbdkqq4dYmWp/?lang=en#>. Acesso em: 26 nov. 2024.

Chelluboina, S., Robin, S., Aswathraj, S., Arunkumas, G., SHWETA CHELLUBOINA, ROBIN, S., S. ASWATHYRAJ, *et al.* "Persistence of antibody response in chikungunya", **Virusdisease**, v. 30, n. 3, p. 469–473, 24 jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00534-5>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6863990/>. Acesso em: 15 out. 2024.

Chia, P.Y.; Ng, M. N.L.; Chu, J. J. H. 2010. Chikungunya fever: a review of a reemerging mosquito-borne infectious disease and the current status. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.

Chen, R. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. J Gen Virol, v. 99, n. 6, p. 761-762, 06 2018. ISSN 1465-2099. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29745869> >. Acesso em: 30 de setembro de 2024

Chen, R., Plante, J.A., Plante, K.S., *et al.* "Lineage Divergence and Vector-Specific Adaptation Have Driven Chikungunya Virus onto Multiple Adaptive Landscapes", **mBio**, v. 12, n. 6, 9 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02738-21>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8576524/>. Acesso em: 3 dez. 2024.

Chikungunya: **Manejo Clínico**. [S.l: s.n.], [S.d.]. Disponível em: https://www.saude.pi.gov.br/uploads/warning_document/file/275/chikungunya-novo-protocolo.pdf.

Chikungunya. 2024. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/chikungunya>. Acesso em: 9 out. 2024.

Chirathaworn, C., Chansaenroj, J., Poovorawan, Y., "Cytokines and Chemokines in Chikungunya Virus Infection: Protection or Induction of Pathology", **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 415, 27 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9060415>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7350363/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Chi, Y.L., Xie, Y., Liu, S.Q., *et al.* "Bardoxolone methyl inhibits the infection of rabies virus via Nrf2 pathway activation in vitro", **Virology Journal**, v. 20, n. 1, 10 nov. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02213-w>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10638713/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Couderc, T., Cherétien, F., Schilte, C., *et al.* "A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease", **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. e29–e29, 11 fev. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040029>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2242832/>. Acesso em: 7 dez. 2024.

Cuadrado, A., Pajares, M., Benito, C., C, *et al.* "Can Activation of NRF2 Be a Strategy against COVID-19?", **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 41, n. 9, p. 598–610, 14 jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.07.003>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7359808/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Diagne, C.T., Bengue, M., Choumet, V., *et al.* "Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms", **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 738–738, 8 set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9090738>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7558846/>. Acesso em: 13 out. 2024.

Dorléans, F., Hoens, B., Najioullah, F., *et al.* "Outbreak of Chikungunya in the French Caribbean Islands of Martinique and Guadeloupe: Findings from a Hospital-Based Surveillance System (2013–2015)", **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1819–1825, 24 abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0719>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6086161/>. Acesso em: 7 dez. 2024.

Dupuis-Maguiraga, L., Noret, M. Brun, S., *et al.* "Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 3, p. e1446–e1446, 27 mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001446>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3313943/>. Acesso em: 7 dez. 2024.

Economopoulou, A., Dominguez, M., Helynck, B., *et al.* "Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion", **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 4, p. 534–541, 11 ago. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0950268808001167>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/atypical-chikungunya-virus-infections-clinical-manifestations-mortality-and-risk-factors-for-severe-disease-during-the-20052006-outbreak-on-reunion/33DA6DD44AA27ACE3B2216FCA688A592>. Acesso em: 7 dez. 2024.

Esposito, D. L. A; Fonseca, B. A. L; 2017. Will Mayaro vírus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? Brazilian Journal of Infectious Diseases. Acesso em: 9 out. 2024

Estrela, JF., Ferreira, MC.; "Estrutura e Patogênese das Principais Arboviroses Humanas no Brasil", Brasília, Brasil. Centro Universitário de Brasília, Faculdade de Ciências da educação e Saúde, 2017 Disponível em: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/235/11654/1/21386095.pdf> Acesso em: 30 de julho de 2024

Febre do Mayaro. 2024. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-do-mayaro>. Acesso em: 9 setembro 2024.

Fernanda, A., "Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV)", **Icts.unb.br**, 25 fev. 2019. DOI: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/35453>. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/handle/10482/35453>. Acesso em: 30 de agosto de 2024

Figueiredo, C. M., Neris, R.L. da S., Gavino-Leopoldino, D., *et al.* "Mayaro Virus Replication Restriction and Induction of Muscular Inflammation in Mice Are Dependent on Age, Type-I Interferon Response, and Adaptive Immunity", *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 1 out. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02246. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02246/full>.

FOO, J., BELLOT, G., PERVAIZ, S., *et al.* "Mitochondria-mediated oxidative stress during viral infection", **Trends in Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 679–692, 19 jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.12.011>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(21\)00318-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X21003188%3Fshoall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(21)00318-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X21003188%3Fshoall%3Dtrue). Acesso em: 29 out. 2024.

Forman, H.J., Zhang, H., "Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy", **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 30 jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8243062/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Franklin M., Priscila, A., Heloísa Ramos Lacerda. "A spatial analysis of co-circulating dengue and chikungunya virus infections during an epidemic in a region of Northeastern Brazil", **Spatial and spatio-temporal epidemiology**, v. 46, p. 100589–100589, 1 ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sste.2023.100589>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877584523000266?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jun. 2024.

Freppel, W., Silva, L.A., Stapleford, K. A., *et al.* "Pathogenicity and virulence of chikungunya virus", **Virulence**, v. 15, n. 1, 28 ago. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2396484>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11370967/#s0004>. Acesso em: 2 dez. 2024.

Ganjian, N., Riviere-Cinamond, A., "Mayaro virus in Latin America and the Caribbean", *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 44, p. 1–1, 10 fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.26633/rpsp.2020.14>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7008609/>. Acesso em: 6 dez. 2024.

Gill, A.J., Kolson, D.L., "Dimethyl Fumarate Modulation of Immune and Antioxidant Responses: Application to HIV Therapy", **Critical Reviews in Immunology**, v. 33, n. 4, p. 307–359, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2013007247>. Acesso em: 26 abr. 2022.

Goupil, B.A., Mores, C.N., "A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis", *The Open Rheumatology Journal*, v. 10, n. 1, p. 129–140, 30 nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874312901610010129>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5204064/>. Acesso em: 6 dez. 2024.

Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D., *et al.* "Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution", **Antioxidants**, v. 13, n. 3, p. 312–312, 1 mar. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox13030312>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/13/3/312>. Acesso em: 9 dez. 2024.

Izurieta, R.O., Macaluso, M., Watts, D.M., *et al.* "Hunting in the rainforest and mayaro virus infection: An emerging alphavirus in Ecuador", **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 317–317, 1 jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-777x.91049>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3249982/>. Acesso em: 1 dez. 2024.

Jaganjac, M., Milkovic, L., Zarkovic, N., *et al.* "Oxidative stress and regeneration", **Free Radical Biology and Medicine**, v. 181, p. 154–165, 8 fev. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584922000570?via%3Dihub>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Jelic, M. D., Mandic, A.D., Maricic, M.S., *et al.* "Oxidative stress and its role in cancer", *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 17, n. 1, p. 22–22, 30 abr. 2019. DOI: https://doi.org/10.4103/jcrt.jcrt_862_16. Disponível em: https://journals.lww.com/cancerjournal/fulltext/2021/17010/oxidative_stress_and_its_role_in_cancer.4.aspx. Acesso em: 8 dez. 2024.

Kaiser, A.E., Baniasadi, M., Giansiracusa, D., *et al.* "Sulforaphane: A Broccoli Bioactive Phytochemical with Cancer Preventive Potential", **Cancers**, v. 13, n. 19, p. 4796–4796, 25 set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13194796>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/19/4796>. Acesso em: 23 jun. 2024.

Kasai, S., Shimizu, S., Tatara, Y., *et al.* "Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology", **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 320–320, 17 fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10020320>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7072240/#abstract1>. Acesso em: 26 nov. 2024.

Khan, N.A., Kar, M., Panwar, A., *et al.* "Oxidative stress specifically inhibits replication of dengue virus", **Journal of General Virology**, v. 102, n. 4, 27 abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001596>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7611606/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Kim, A.S., Diamond, M.S., "A molecular understanding of alphavirus entry and antibody protection", **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 396–407, 6 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00825-7>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9734810/>. Acesso em: 30 nov. 2024.

Kozaki, T., Komano, J. Kanbayashi, D., *et al.* "Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 10, p. 2681–2686, 17 fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1621508114>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5347618/>. Acesso em: 13 jul. 2024.

Levi, L., Vignuzzi, M., "Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threat?", **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 133–133, 14 maios 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050133>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6560413/>. Acesso em: 1 dez. 2024.

Mendes, A., Kuhn, R. J. "Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly", *Viruses*, v. 10, n. 3, p. 138–138, 20 mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10030138>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/3/138>. Acesso em: 30 de maio de 2024.

Miranda, I. A., Oliveira, C. C., Poian, A. T., "Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis", **BioMed research international**, v. 2013, p. 1–11, 1 jan. 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1155/2013/973516>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771267/>. Acesso em: 13 jun. 2024.

Mohite, A.A., Fernandez, A.A., "Chikungunya fever presenting with acute optic neuropathy", **BMJ Case Reports**, p. bcr2015210081–bcr2015210081, 28 jul. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1136/bcr-2015-210081>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4521522/>. Acesso em: 7 dez. 2024.

Mondolfi, A. E. P., Morales, A. J. R., Blohm, G., *et al.*, "ChikDenMaZika Syndrome: the challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics", **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 15, n. 1, 22 jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0157-x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4957883/>. Acesso em: 13 jun. 2024.

Mostafavi, H., Abeyratne, E., Zaid, A., *et al.* "Arthritogenic Alphavirus-Induced Immunopathology and Targeting Host Inflammation as A Therapeutic Strategy for Alphaviral Disease", **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 290–290, 22 mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11030290>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6466158/>. Acesso em: 11 jun. 2024.

Mourão, M.P.G., Bastos, M.S., Figueiredo, R.P., *et al.* "Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008", **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42–46, 16 set. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0669>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3249893/>. Acesso em: 6 dez. 2024.

Nascimento, L.C.J., Carvalho, C.X., Silva, M.M.O., *et al.* "Acute-Phase Levels of CXCL8 as Risk Factor for Chronic Arthralgia Following Chikungunya Virus Infection", **Frontiers in Immunology**, v. 12, 1 out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744183>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8517435/>. Acesso em: 3 dez. 2024.

Ng, L.F.P., Chow, A., Sun, Y.J., *et al.* "IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity", **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. e4261–e4261, 21 jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004261>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2625438/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Ng, W., Amaral, K., Javelle, E., *et al.* "Chronic chikungunya disease (CCD): clinical insights, immunopathogenesis and therapeutic perspectives", **QJM**, v. 117, n. 7, p. 489–494, 19 fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcae028>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11290245/>. Acesso em: 7 dez. 2024.

Oliveira Lopes da Silva, M.; Menezes Figueiredo, C.; Leão da Silva Neris, R.; Guimarães-Andrade, IP; Gavino-Leopoldino, D.; Linhares Miler-da-Silva, L.; da Maia Valença, H.; Ladislau, L.; Victorino Félix de Lima, C.; Meireles Coccarelli, F.; Farias Benjamim, C.; Miranda, I. "Chikungunya and Mayaro Viruses Induce Chronic Skeletal Muscle Atrophy Triggered by Pro-Inflammatory and Oxidative Response", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 16, p. 8909–8909, 16 ago. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25168909>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11354814/#abstract1>. Acesso em: 3 dez. 2024.

Pant, T., Uche, N., Juric, M., *et al.* "Regulation of immunomodulatory networks by Nrf2-activation in immune cells: Redox control and therapeutic potential in inflammatory diseases", **Redox Biology**, v. 70, p. 103077–103077, 11 fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103077>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231724000533?via%3Dihub#sec6>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Pang, Z., Jiang, Z., Zhu, R., *et al.*, "Bardoxolone-Methyl Prevents Oxidative Stress-Mediated Apoptosis and Extracellular Matrix Degradation in vitro and Alleviates Osteoarthritis in vivo", **Drug design, development and therapy**, v. Volume 15, p. 3735–3747, 1 set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.2147/dddt.s314767>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8428116/>. Acesso em: 23 jun. 2024.

Pathak, H., Mohan, M.C., Ravindran, V., "Chikungunya arthritis", **Clinical Medicine**, v. 19, n. 5, p. 381–385, 1 set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.7861/clinmed.2019-0035>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6771335/>. Acesso em: 1 dez. 2024.

Pereira, T.N., Carvalho, F.D., Farias, S., *et al.* "Vector competence of Aedes aegypti, Aedes albopictus, and Culex quinquefasciatus mosquitoes for Mayaro virus", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 4, p. e0007518–e0007518, 14 abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007518>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7182273/>. Acesso em: 1 dez. 2024.

Perpétua, A., Araújo, R.L., Nascimento, J. dos S., "Chikungunya: vision of the pain clinician", **Revista Dor**, v. 17, n. 4, p. 299–302, 1 jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160093>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rdor/a/dGhVQDFCHDkwbPK8C5vZzQJ/?lang=pt#ModalTutorss1>. Acesso em: 13 jul. 2024.

Powers, A. M., Brault, A. C., Yukio Shirako, *et al.* "Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses", **Journal of virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 1 nov. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.75.21.10118-10131.2001>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC114586/>. Acesso em: 10 jun. 2024.

Renault, F., Solet, J.L., Sissoko, D., Balleydier, E., Larrieu, S., *et al.* "A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006", **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 4, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17978079/>. Acesso em: 11 jun. 2024.

Romero-Leiton, J. P., Kamal Raj Acharya, Jane Elizabeth Parmley, *et al.* "Modelling the transmission of dengue, zika and chikungunya: a scoping review protocol", **BMJ open**, v. 13, n. 9, p. e074385–e074385, 1 set. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-074385>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10510863/>. Acesso em: 9 jun. 2024.

Sadasivam, N., Kim, Y.J., Radhakrishnan, K., *et al.* "Oxidative Stress, Genomic Integrity, and Liver Diseases", **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3159–3159, 15 maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27103159>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9147071/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Santiago, F.W., Halsey, E., Siles, C., *et al.* "Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004104, 23 out. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004104>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4619727/>. Acesso em: 6 dez. 2024.

Sato, T., Maeta, T., Ito, S., "Dimethyl Fumarate Suppresses the Proliferation of HTLV-1-infected T Cells by Inhibiting CBM Complex-triggered NF- κ B Signaling", **Anticancer Research**, v. 43, n. 5, p. 1901–1908, 25 abr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.21873/anticancer.16349>. Disponível em: <https://ar.iiajournals.org/content/43/5/1901>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Sausen, D.G., Bhutta, M.S., Gallo, E.S., *et al.* "Stress-Induced Epstein-Barr Virus Reactivation", **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1380–1380, 18 set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11091380>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8470332/#sec1-biomolecules-11-01380>. Acesso em: 9 dez. 2024.

Seyler, T., Hutin, E., Ramanchandran, V., *et al.* "Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Andhra Pradesh, India, 2005–2006", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 133–138, 1 fev. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.014>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19709705/>. Acesso em: 11 jun. 2024.

Silva, LA, Dermody, TS "Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies", v.127, n. 3, p. 737 – 749, 1 de março de 2017. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci84417>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5330729/>. Acesso em: 30 de maio de 2024

Simon, F., Javelle, E., Cabie, A., *et al.* "French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014", **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 7, p. 243–263, 25 jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X15001444?via%3Dihub>. Acesso em: 7 dez. 2024.

Sohler, M.P., Soares, C.N., Christo, P.P., *et al.*, "Review of dengue, zika and chikungunya infections in nervous system in endemic areas", **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 81, n. 12, p. 1112–1124, 1 dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0043-1777104>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/anp/a/gpksDFZGsP59p643qWPKGKQ/?lang=en>. Acesso em: 23 jun. 2024.

Santos, F.M., Dias, R.S., Oliveira, M.D., *et al.* "Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007375–e0007375, 3 maio 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007375>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6519846/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Suchowiecki, K., Reid, S.P., Simon, G.L., *et al.* "Persistent Joint Pain Following Arthropod Virus Infections", **Current Rheumatology Reports**, v. 23, n. 4, 1 abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11926-021-00987-y>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8042844/>. Acesso em: 30 nov. 2024.

Suhrbier, A., Christine, M. J. B., Gasque, P. "Arthritogenic alphaviruses—an overview", **Nature reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420–429, 8 maio 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.64>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2012.64>. Acesso em: 13 jun. 2024..

Tappe, D., Pérez-Girón, J.V., Just-Nübling, G., *et al.* "Sustained Elevated Cytokine Levels during Recovery Phase of Mayaro Virus Infection", **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 4, p. 750–752, 1 mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2204.151502>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4806971/>. Acesso em: 8 dez. 2024.

Tatsuya Kozaki, Jun Komano, Daiki Kanbayashi, *et al.*, "Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 10, p. 2681–2686, 17 fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1621508114>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1621508114>. Acesso em: 23 jun. 2024.

Teles, J.O. N., Souza, J. de P., RODRIGUES, D., *et al.* "Acute Chikungunya Infection Induces Vascular Dysfunction by Directly Disrupting Redox Signaling in Endothelial Cells", **Cells**, v. 13, n. 21, p. 1770–1770, 25 out. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells13211770>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11544861/#B15-cells-13-01770>. Acesso em: 28 nov. 2024.

Thoisy, B., Gardon, J., Salas, R.A., *et al.* "Mayaro Virus in Wild Mammals, French Guiana", **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326–1329, 1 out. 2003. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0910.030161>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3033094/>. Acesso em: 1 dez. 2024.

Timpani, C.A., Rybalka E. "Calming the (Cytokine) Storm: Dimethyl Fumarate as a Therapeutic Candidate for COVID-19", **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 1, p. 15–15, 26 dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14010015>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/1/15>. Acesso em: 23 jun. 2024.

Vigilância. 2024 **Vigilância**. 2024. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-do-mayaro/vigilancia>. Acesso em: 12 jun. 2024.

Wei, L.L.L., Tom, R., Kim, Y.,C., "Mayaro Virus: An Emerging Alphavirus in the Americas", **Viruses**, v. 16, n. 8, p. 1297, 14 ago. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16081297>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11359717/>. Acesso em: 1 dez. 2024.

Werneke, S.W., Schilte, C., Rohatgi, A., *et al.* "ISG15 Is Critical in the Control of Chikungunya Virus Infection Independent of UBE1L Mediated Conjugation", **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002322–e1002322, 20 out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002322>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3197620/#ppat-1002322-g006>. Acesso em: 3 dez. 2024.

Young, A.R., Locke, M.C., Cook, L.E., *et al.* "Dermal and muscle fibroblasts and skeletal myofibers survive chikungunya virus infection and harbor persistent RNA", **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 8, p. e1007993, 29 ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007993>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6715174/>. Acesso em: 3 dez. 2024.

Zaid, A., Gérardin, P., Taylor, A., *et al.* "Review: Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management", **Arthritis & Rheumatology**, v. 70, n. 4, p. 484–495, 29 dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.40403>. Disponível em: <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40403>. Acesso em: 1 dez. 2024.

Zeller, H., Van Bortel, W., Sudre, B., "Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014", **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S436–S440, 5 dez. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw391>. Disponível em: https://academic.oup.com/jid/article/214/suppl_5/S436/2632642?login=false. Acesso em: 30 nov. 2024.