

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Thaiane Pinto Moreira

**MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NA GÊNESE E
MANUTENÇÃO DA HIPERNOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO
CHIKUNGUNYA VIRUS**

Belo Horizonte

2022

Thaiane Pinto Moreira

**MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NA GÊNESE E
MANUTENÇÃO DA HIPERNOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO
CHIKUNGUNYA VIRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial à obtenção do
título de doutor em Ciências:
Microbiologia.

Orientadora: Dra. Daniele da Glória de Souza

Co-orientadora: Dra. Vivian Vasconcelos Costa

Belo Horizonte

2022

043

Moreira, Thaiane Pinto.

Mecanismos e mediadores envolvidos na gênese e manutenção da hipernocicepção induzida pelo Chikungunya vírus [manuscrito] / Thaiane Pinto Moreira. – 2022.

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

Orientação: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza. Coorientação: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Infecções. 4. Nociceptividade. 5. Camundongos. I. Souza, Danielle da Glória de. II. Costa, Vivian Vasconcelos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **THAIANE PINTO MOREIRA**

Nº REGISTRO: 2018707706

Às 08:30 horas do dia **08 de junho de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Renato Santana de Aguiar (Departamento de Genética, Ecologia e Evolução/ICB/UFMG), Flávio Almeida Amaral (Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG), Thiago Mattar Cunha (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP), Marcelo Torres Bozza (Departamento de Microbiologia/UFRJ), Prof. Dra. Daniele da Glória de Souza (Orientadora) e a Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski (Coorientadora), para julgar o trabalho final **“Mecanismos e mediadores envolvidos na gênese e manutenção da hipernocicepção induzida pelo chikungunya virus”** da aluna **Thaiane Pinto Moreira**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Dra. Daniele da Glória de Souza, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da Banca:

Prof. Dr. Renato de Santana Aguiar

Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

De acordo:

Prof. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Orientadora)

Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski

(Coorientadora)

Prof. Daniel de Assis Santos

(Subcoordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 10/06/2022, às 07:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 10/06/2022, às 09:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 13/06/2022, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2022, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Mattar Cunha, Usuário Externo**, em 14/06/2022, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 28/06/2022, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Torres Bozza, Usuário Externo**, em 02/08/2022, às 19:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1407518** e o código CRC **8AC02B4F**.

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, da minha trajetória profissional. A todos os professores, colegas e orientadoras do Anglo, UFSJ e UFMG: saibam que vocês tiveram um impacto gigantesco para eu me tornar quem sou hoje. A todos vocês que guardo com carinho no coração, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Danielle e Vivian, que me acolheram com tanto amor desde que nos conhecemos e me deram oportunidades incríveis ao longo desses 6 anos de caminhada. Sou imensamente grata pela orientação, aprendizado, carinho, amizade e parceria que construímos. Vocês fizeram parte de uma fase muito transformadora e enriquecedora da minha vida e por isso serão sempre lembradas com todo o carinho que tenho. De coração, muito obrigada!

Aos colegas e professores do grupo de Imunofarmacologia que contribuíram de várias e diferentes formas para a realização deste trabalho. Muito obrigada pela ajuda diária e pelo convívio durante esses anos.

Aos meus amigos do Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro que se tornaram uma segunda família. Obrigada por trazerem alegria aos dias cansativos e tornarem tudo muito mais leve e divertido! Em especial a Brenda, Camila, Carla, Franciele, Ian, Jordane, Micheli, Thales e Vidy, obrigada pelas ajudas (tão constantes) e por todas as discussões enriquecedoras. Tenho certeza que nosso laço é duradouro! Amo vocês!

Às queridas Gil, Frank, Ilma e Rose por possibilitarem um ambiente de trabalho adequado e por sempre serem tão solícitas a nos ajudar! Vocês são sensacionais! Em especial, quero agradecer à Frank e Gil pelo carinho e palavras amigas de todos os dias!

Aos Programa de Pós Graduação em Microbiologia e todo o seu corpo docente pela sua excelência no ensino.

À CAPES, CNPq e INCT em dengue por todo o suporte financeiro.

Aos professores Maurício Nogueira e Suresh Mahalingam, agradeço pelas amostras de vírus concedidas.

Aos amigos externos e familiares por me ajudarem em tantas situações e me proporcionarem os vários momentos de lazer e descontração tão necessários.

Por fim, quero agradecer à minha família. Aos meus queridos pais, Tarcísio e Silvana, por todas as oportunidades que me deram para que eu chegasse até aqui. Essa conquista é nossa! Às minhas irmãs, Tarcila e Thaiss, por todo apoio e incentivo desde sempre. À minha vovó Indiana por todo o carinho e participação em todas as etapas da minha vida. Em especial, minha eterna gratidão à Tarcila e ao meu cunhado, Rogério, por me acolherem de fato como uma irmã e me ajudarem de forma ímpar durante os percalços da pós graduação. Todos vocês são incríveis e eu tenho sorte por tê-los!

"Se as coisas são inatingíveis, não é motivo para não querê-las. Que tristes os caminhos, se não
fora a presença distante das estrelas."

(Mário Quintana)

RESUMO

A infecção pelo chikungunya virus tem como principal característica a poliartralgia inflamatória crônica sendo associada a uma elevada taxa de morbidade da população acometida. Até o momento, os mediadores e mecanismos associados ao desenvolvimento da artralgia crônica nestes pacientes são desconhecidos e as medidas de tratamento disponíveis são paliativas e inespecíficas. Neste trabalho, usando um modelo experimental, estudamos alguns mecanismos e mediadores envolvidos na gênese e manutenção da hipernocicepção induzida pelo CHIKV. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram infectados com 10^6 PFU de CHIKV por via intraplantar e diversas análises foram realizadas em tempos pré-estabelecidos. Os resultados demonstraram que a infecção pelo CHIKV induziu hipernocicepção mecânica prolongada e sensibilidade térmica nos animais. Foi observado um intenso dano tecidual e aumento dos níveis de mediadores inflamatórios no coxim plantar, como TNF e IL-6. Um aumento na expressão de CXCL-1, CCR5 e COX-2 no 1º dia pós-infecção e de TNF no 7º e 14º dias no gânglio da raiz dorsal (DRG) também foi observado. Em seguida, o tratamento com fármacos de diferentes classes terapêuticas com potencial analgésico foi realizado. Os tratamentos com morfina e pregabalina (ação central) reverteram o fenótipo hipernociceptivo dos camundongos nas fases aguda e tardia da infecção. Por outro lado, os tratamentos com dexametasona ou naproxeno (ação antiinflamatória) foram eficazes apenas no controle da hipernocicepção aguda induzida pela CHIKV. Por fim, avaliamos o papel da citocina TNF na indução e manutenção da hipernocicepção após a infecção pelo CHIKV, utilizando animais TNFRp55^{-/-} ou através da inibição farmacológica dessa molécula (etanercept). Os nossos dados demonstraram que a ausência de TNF melhorou os parâmetros de doença nos animais avaliados, uma vez que apresentaram menor hipernocicepção, menor dano tecidual na pata, menor produção de mediadores pró-inflamatórios e aumento de IL-10, uma citocina com atividade anti-inflamatória, o que abre perspectivas para um potencial alvo terapêutico. Assim, nossos dados sugerem que a gênese da hipernocicepção induzida pelo CHIKV é dependente da inflamação aguda local, mas a sua manutenção parece estar associada a um estado inflamatório no DRG dos animais, mais especificamente a um aumento na expressão de TNF nesse tecido em tempos mais tardios.

Palavras-chave: Dor, Infecção, Inflamação, Virus, Artralgia, Chikungunya virus.

ABSTRACT

The main characteristic of chikungunya virus infection is chronic inflammatory polyarthralgia, which is associated with a high morbidity rate in the affected population. To date, the mediators and mechanisms associated with the development of chronic arthralgia in these patients are unknown and the available treatment measures are palliative and nonspecific. Here, using an experimental model, we studied some mechanisms and mediators involved in the genesis and maintenance of CHIKV-induced hypernociception. C57BL/6 wild type (WT) mice were infected with 10^6 PFU of CHIKV intraplantarly and several analyzes performed at pre-established times. The results showed that CHIKV infection induced prolonged mechanical hypernociception and thermal sensitivity. Intense tissue damage and increased levels of inflammatory mediators in the footpad, such as TNF and IL-6, were observed. An increase in the expression of CXCL-1, CCR5 and COX-2 on the 1st day post-infection and of TNF on the 7th and 14th days in the dorsal root ganglion (DRG) was also observed. Then, treatment with drugs of different therapeutic classes with analgesic potential was performed. Treatments with morphine and pregabalin (central action) reversed the hypernociceptive phenotype of mice in the acute and late phases of infection. On the other hand, treatments with dexamethasone or naproxen (anti-inflammatory action) were effective only in controlling CHIKV-induced acute hypernociception. Finally, we evaluated the role of the cytokine TNF in the induction and maintenance of hypernociception after CHIKV infection, using TNFRp55^{-/-} mice or through the pharmacological inhibition of this molecule (etanercept). Our data showed that the absence of TNF improved disease parameters in the evaluated animals, since they showed less hypernociception, less tissue damage in the paw, less production of pro-inflammatory mediators and an increase in IL-10, a cytokine with anti-inflammatory activity, which opens perspectives for a potential therapeutic target. Thus, our data suggest that the genesis of CHIKV-induced hypernociception is dependent on local acute inflammation, but its maintenance seems to be associated with an inflammatory state in the DRG, more specifically with an increase in TNF expression in this tissue at later times.

Keywords: Pain, Infection, Inflammation, Virus, Arthralgia, Chikungunya virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica dos casos relatados de febre chikungunya no mundo em 2016 (Página 15)

Figura 2: Ciclo de transmissão do vírus chikungunya pelo mosquito vetor em ciclo enzoótico e urbano (Página 16).

Figura 3: Representação esquemática da estrutura conformacional e genética do vírus chikungunya (Página 17).

Figura 4: Ciclo de multiplicação do vírus chikungunya. Figura 5: Sinais da febre chikungunya (Página 19).

Figura 6: Receptores sensoriais (Página 26).

Figura 7: Mecanismo de transmissão do impulso de dor da periferia até o SNC (Página 28).

Figura 8: Dor nociceptiva (Página 31).

Figura 9: Dor inflamatória (Página 35).

Figura 10: A infecção via intraplantar pelo CHIKV em camundongos imunocompetentes induz hipernocicepção mecânica e térmica, ao passo que a inoculação do vírus por via intra-articular altera o limiar mecânico sem interferir com a sensibilidade térmica (Página 48).

Figura 11: Representação dos esquemas de tratamento farmacológico nos animais infectados pelo CHIKV (Página 49).

Figura 12: A administração de morfina ou pregabalina em animais infectados pelo CHIKV revertem a hipernocicepção apenas durante o período de tratamento (Página 51).

Figura 13: O tratamento de animais infectados pelo CHIKV com anti-inflamatórios foi eficaz para o controle da hipernocicepção aguda (Página 53).

Figura 14: O tratamento intratecal com celecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2, melhora a hipernocicepção aguda induzida pela infecção pelo CHIKV (Página 54).

Figura 15: A infecção pelo CHIKV induz aumento na expressão de TNF, CXCL-1, CCR5 e COX2 no DRG de camundongos (Página 55).

Figura 16: A ausência de receptor de TNF atenua o fenótipo de hipernocicepção dos animais infectados pelo CHIKV e retarda o clearance viral (Página 57).

Figura 17: A ausência de receptor de TNF melhora os parâmetros inflamatórios associados à infecção pelo CHIKV (Página 59).

Figura 18: O tratamento com etanercept (ETA), um inibidor de TNF, melhora hipernocicepção induzida pela infecção pelo CHIKV (Página 61).

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

%; Porcento

A. aegypti: *Aedes aegypti*

A. albopictus: *Aedes albopictus*

AINES: Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazelopropiônico

cAMP: AMP cíclico

CCL: Quimiocina CC Ligante

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CHIKF: Febre chikungunya

CHKV: Chikungunya virus

CLEC4M: *C-type lectin domain family 4 member M*

COX: Enzimas ciclooxigenases

CXCL: Quimiocina CXC Ligante

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DN: Dor neuropática

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DRG: *Dorsal Root Ganglion* (Gânglio da raiz dorsal)

ECSA: *East/Central/South African genotype*

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic Acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EGF: *Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidérmico)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

EPM: Erro Padrão da Média

FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos)

H&E: Hematoxilina & Eosina

h: hora (unidade de tempo)

HTAB: *Hexadecyltrimethylammonium Bromide* (Brometo de hexadeciltrimetilamônio)

i.pl.: Intraplantar

IASP: *International Association for the Study of Pain*

IFN: Interferon

Ig: Imunoglobulinas
IL: *Interleukin* (Interleucina)
IOL: *Indian Ocean Lineage*
Min: Minutos (unidade de tempo)
mL: Mililitro (unidade de volume)
MPO: Mieloperoxidase
NGF: Neurotrofinas
NI: Não infectados
NMDA: N-metil- aspartato
NT: Neurotransmissores
°C: grau Celcius (escala de medida de temperatura)
OD: Optical Density (densidade ótica)
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPD: O-Phenylenediamine Dihydrochloride – Orto-fenilenodiamina
p.i.: Pós-infecção.
PBS: Phosphate-Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)
PFU: Plaque Forming Unit (Unidade formadora de placa)
PK: Proteína kinase
PTGs: Prostaglandinas
RANKL: *Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (Ligante do receptor do fator nuclear kapa B)
RRV: *Alphavirus Ross River*
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SFB: *Serum Fetal Bovine* (Soro fetal bovino)
SNC: Sistema Nervoso Central
SNP: Sistema Nervoso Periférico
SNS: Sistema Nervoso Simpático
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
WT: *Wild Type* (Animais selvagens)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Breve histórico e contexto atual do vírus chikungunya	14
1.2. Transmissão do vírus chikungunya.....	16
1.3. O vírus chikungunya	17
1.4. A doença causada pelo vírus chikungunya.....	20
1.5. Patogênese e dor articular associada à infecção pelo vírus chikungunya	21
1.6. Aspectos gerais da dor	25
1.7. Principais mediadores inflamatórios envolvidos no processo nociceptivo.....	35
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. Vírus.....	40
4.2. Animais e células	40
4.3. Fármacos	40
4.4. Propagação e concentração do vírus	41
4.5. Determinação da carga viral.....	41
4.6. Medida do edema plantar.....	43
4.7. Medida da hipernocicepção articular	43
4.8. Quantificação indireta de neutrófilos (MPO).....	44
4.9. ELISA	44
4.10. Análise histopatológica	46
4.11. Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS	47
5.1. A infecção intraplantar pelo CHIKV em camundongos imunocompetentes induz hipernocicepção mecânica e térmica.....	47

SUMÁRIO

5.2. O tratamento farmacológico dos camundongos infectados pelo CHIKV com diferentes analgésicos foi eficaz no controle da hipernocicepção.	49
5.2.1. A administração de morfina ou pregabalina em animais infectados pelo CHIKV revertem a hipernocicepção apenas durante o período de tratamento.....	49
5.2.2. O tratamento de animais infectados pelo CHIKV com anti-inflamatórios foi eficaz para o controle da hipernocicepção aguda.....	52
5.3. A infecção pelo CHIKV induz aumento na expressão de CXCL-1, TNF, CCR5 e COX-2 no gânglio da raiz dorsal (DRG) de camundongos	55
5.4. A ausência de receptor de TNF está associada a uma melhora nos parâmetros clínicos e inflamatórios da infecção pelo CHIKV	56
6. DISCUSSÃO	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Breve histórico e contexto atual do vírus chikungunya

O primeiro surto identificado de febre chikungunya (CHIKF), com incidência estimada em 23%, foi relatado em 1952-1953 ao longo dos planaltos costeiros de Mawia, Makonde e Rondo localizados no leste africano, atualmente conhecido como Tanzânia (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Após este primeiro surto, diversas epidemias foram descritas entre as décadas de 1960-1990 na República Centro-Africana, Guiné, Burundi, Angola, Uganda, Malawi, Nigéria, República Democrática do Congo e vários outros países africanos. Na Ásia, o chikungunya virus (CHIKV) foi relatado pela primeira vez durante um surto em Bangkok, Tailândia, em 1958. Então, o vírus se espalhou para outros países até 1964 provocando diversas epidemias e depois ressurgiu em 1975-1976 com alguns casos esporádicos (WAHID *et al.*, 2017).

Em 2004, um grande surto na costa do Quênia atingiu mais de 70% da população local, resultando em quase meio milhão de casos, e se espalhou para as ilhas do Oceano Índico (Comores, Mayotte, Seychelles, La Reunion, Sri Lanka e Maurício) até 2005 (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Em 2005-2006, a ilha de La Reunion, que possui uma população de aproximadamente 750.000 habitantes, vivenciou uma grande epidemia que resultou em mais de 260.000 casos (cerca de um terço da população), entre os quais diversas complicações clínicas incomuns e graves foram relatadas, como, por exemplo, miocardite e pneumopatia aguda (STAIKOWSKY *et al.*, 2009; ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Na Ásia, o CHIKV reapareceu em 2005 em um dos maiores surtos já descritos, no qual aproximadamente 1,3 milhões de casos foram relatados em 13 estados da Índia (BURT *et al.*, 2017). Na Europa, o primeiro surto de CHIKV autóctone foi relatado no nordeste da Itália em 2007, o qual se disseminou e resultou em um total de 214 casos confirmados. Ainda, um número significativo de casos na França foi confirmado nos anos de 2010, 2013 e 2014 (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Nas Américas, o surgimento do CHIKV ocorreu em 2013 na ilha de São Martinho (Caribe) e, desde então, diversos novos casos foram identificados em 45 países no Caribe, América do Sul e América Central, com mais de um milhão de casos suspeitos e 25.000 casos confirmados nestas regiões (WAHID *et al.*, 2017).

No Brasil, o primeiro caso autóctone da CHIKF foi confirmado em 2014 no município de Oiapoque, Amapá. Nesse ano também foram confirmados 37 casos importados em 11 estados brasileiros (Ministério da Saúde, 2014). Desde então, o vírus se disseminou para todo o território brasileiro. Entre 2014 e 2019, foram notificados 589.076 casos prováveis e 495 óbitos confirmados por CHIKF, sendo 2016 e 2017 os anos com maiores coeficientes de incidência, 114 e 89 casos por 100 mil habitantes, respectivamente. Além disso, os dados epidemiológicos mostram que a média de idade dos óbitos foi de 68 anos e a comorbidade mais frequente nos

óbitos foi hipertensão arterial (Ministério da Saúde, 2019). De acordo com o último Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde, 2022), referente às notificações ocorridas entre as Semanas Epidemiológicas (SE) 1 e 13 (02/01/2022 a 02/04/2022), foram notificados 28.291 casos prováveis e 5 óbitos confirmados no país (8 ainda estão sob investigação), concentrados principalmente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Esses números correspondem a um aumento de 14,7% dos casos em relação ao ano de 2021 (Ministério da Saúde, 2022).

Atualmente, o CHIKV está distribuído geograficamente em mais de 60 países, permanecendo endêmico na África, na Índia e em vários países do Sudeste Asiático, bem como na América Latina, conforme demonstrado na figura 1 (MATHEW *et al.*, 2017; CONSTANT *et al.*, 2021). Essa elevada distribuição ao redor do globo se deve principalmente à prevalência do mosquito vetor e sua alta eficiência na transmissão do vírus, além do processo de urbanização e fácil deslocamento de indivíduos virêmicos pelo mundo devido à modernização dos meios de transporte (WAHID. *et al.*, 2017).

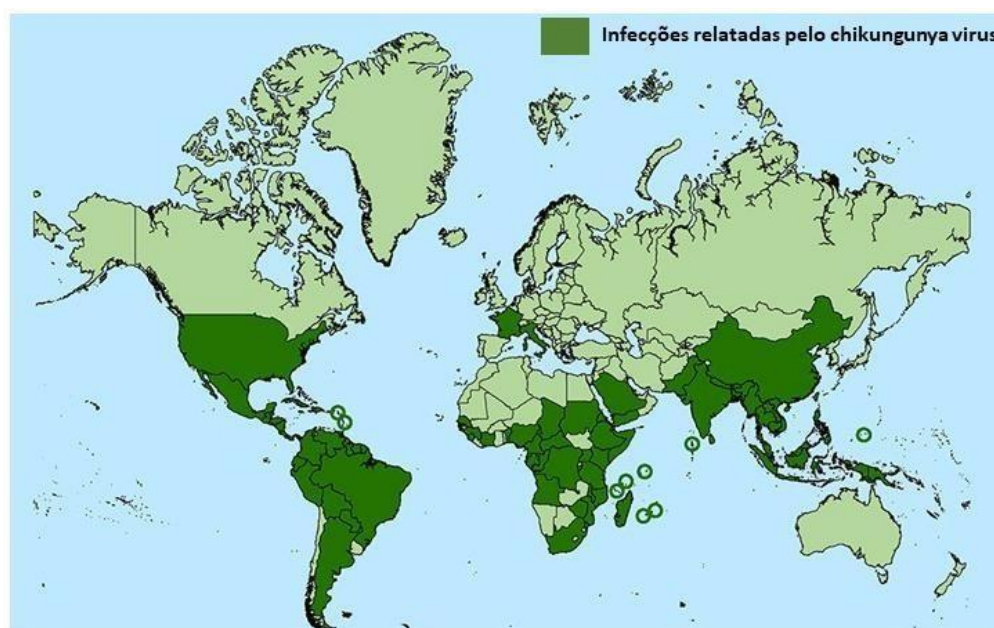


Figura 1: Distribuição geográfica dos casos relatados de febre chikungunya no mundo em 2020.

Adaptado de CDC, 2020.

1.2. Transmissão do vírus chikungunya

O CHIKV circula na natureza por meio de dois ciclos de transmissão, sendo eles o ciclo enzoótico e urbano, como representado pela figura 2. O primeiro é comum principalmente na África, em áreas de florestas ou savanas com a presença de vetores competentes, onde o vírus é transmitido por várias espécies do mosquito *Aedes* (*A. africanus*, *A. cordellieri*, *A. furcifer-taylori*, *A. luteocephalus*, entre outros) a primatas não humanos (macacos), os quais se apresentam como reservatório do vírus (NG & HAPUARACHCHI, 2010). A infecção do homem pode eventualmente ocorrer quando ele adentra estes ambientes selvagens e, conseqüentemente, pode dar início ao ciclo urbano. Esse, por sua vez, envolve duas espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, altamente urbanizados, o *A. aegypti* e o *A. albopictus*, os quais transmitem o vírus ao homem por meio da picada (GALÁN- HUERTA *et al.*, 2015). Vale ressaltar que o principal vetor na transmissão do CHIKV tem sido historicamente o *A. aegypti*, mas a mutação A226 na proteína viral E1 aumentou a aptidão do CHIKV aos *A. albopictus* e conferiu melhor transmissibilidade do vírus para espécies de vertebrados, como o homem (GANESAN *et al.*, 2017).

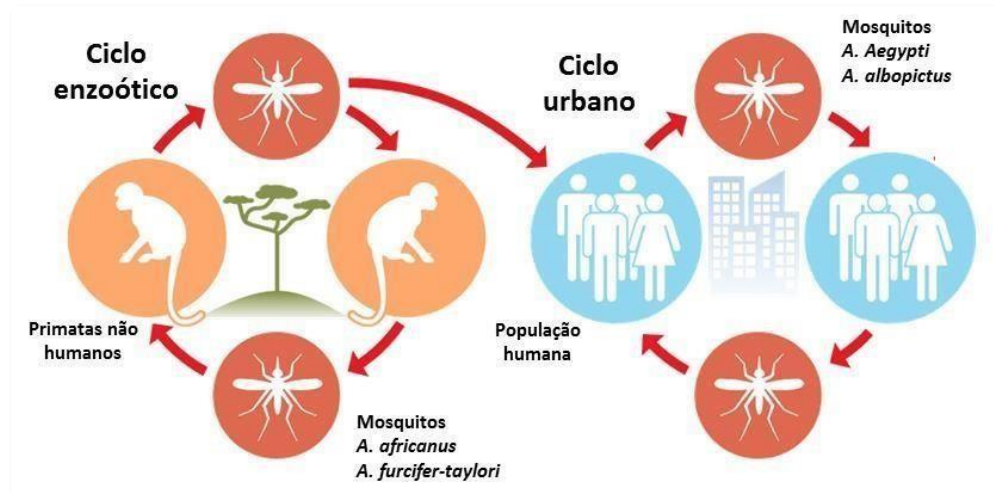


Figura 2: Ciclo de transmissão do vírus chikungunya pelo mosquito vetor em ciclo enzoótico e urbano. No ciclo enzoótico, os vetores são mosquitos com hábitos silvestres e os primatas não humanos são os principais hospedeiros, reservatórios e disseminadores do vírus. Nesse ciclo, o homem participa como um hospedeiro acidental ao adentrar áreas de mata. Já no ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica e a transmissão ocorre a partir do vetor urbano infectado, o *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*, na maioria dos casos. Adaptado de CDC & PLOS & REUTERS.

Além dos ciclos descritos acima, outras formas de transmissão têm sido relatadas, como por exemplo, nosocomiais (PAROLA *et al.*, 2006), vertical (GÉRARDIN *et al.*, 2008), via doação de sangue (SIMMONS *et al.*, 2016) e enxerto da córnea (COUDERC *et al.*, 2012).

1.3. O vírus chikungunya

O *Chikungunya virus* é um arbovírus pertencente ao reino *Riboviria*, família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, envelopado e com estrutura icosaédrica. Conforme demonstrado na imagem A da figura 3, o vírion apresenta um diâmetro de aproximadamente 70-100nm e é composto por unidades repetidas de glicoproteínas transmembrana (E1 e E2), a proteína do capsídeo (C) e uma bicamada lipídica (HER *et al.*, 2009). Seu genoma consiste de um RNA de fita simples com polaridade positiva, com tamanho aproximado de 12kb e duas janelas abertas de leitura. Quando traduzido, codifica duas poliproteínas, as quais, quando clivadas, dão origem a quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) na extremidade 5' e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K/TF e E1) na extremidade 3', conforme demonstrado na imagem B da figura 3 (BURT *et al.*, 2017).

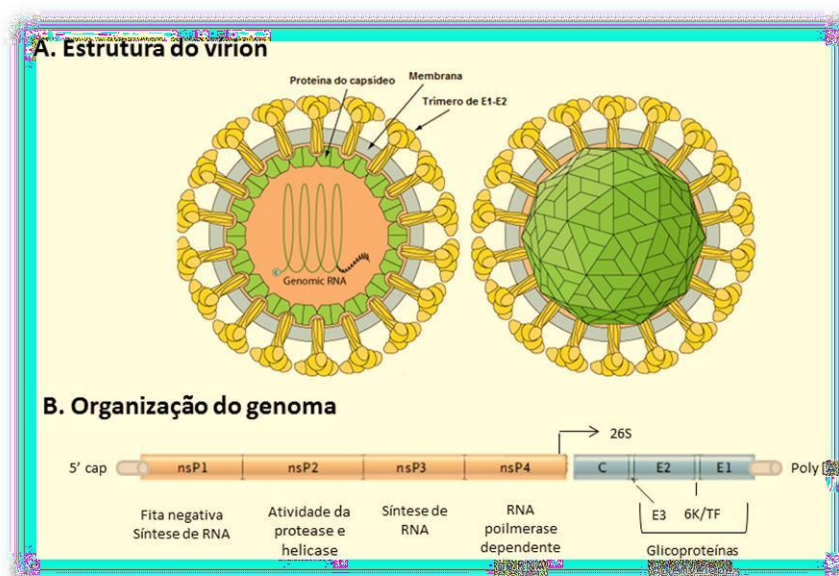


Figura 3: Representação esquemática da estrutura conformacional e genética do vírus chikungunya. A imagem A mostra a estrutura icosaédrica do vírion, a qual é composta por três proteínas estruturais, sendo elas as proteínas do envelope (E1 e E2) e a proteína do capsídeo (C). Conforme a mesma figura, as proteínas E1 e E2 formam tríades de glicoproteínas, em forma de espigões, ancorados na membrana que cobrem a superfície viral. Já a imagem B mostra a organização do genoma do vírus, incluindo suas proteínas não estruturais 1 a 4 (nsP1-nsP4) e proteínas estruturais (E1-E3, C, 6K/TF). Adaptado de WEAVER & LECUIT, 2015; Swiss Institute of Bioinformatics, viralZone, 2017.

De acordo com análises filogenéticas, até o momento existem quatro linhagens do CHIKV identificadas, as quais apresentam características genótípicas e antigênicas distintas e únicas: (1) O genótipo do Oeste Africano que consiste em isolados do Senegal e da Nigéria; (2) O genótipo do Leste/Centro/Sul Africano (ECSA), outro genótipo enzoótico encontrado na África; (3) Isolados de países da Ásia que estão incluídos no genótipo Asiático e, finalmente, (4) o genótipo mais recente, uma Linhagem do Oceano Índico (IOL), o qual se espalhou das ilhas Comores em 2004 e resultou em epidemias graves no sudeste asiático e na Índia durante os anos 2005-2008 (GALÁN- HUERTA *et al.*, 2015; WAHID *et al.*, 2017). No Brasil, sabe-se que há a circulação de dois genótipos do vírus chikungunya, o ECSA e o Asiático, sendo o primeiro o principal responsável por diversos surtos no país. Contudo, existe uma imensa dificuldade em mensurar a proporção e distribuição de pacientes infectados por cada genótipo, bem como avaliar a possibilidade de co-infecção (MACHADO *et al.*, 2019).

O ciclo de multiplicação do CHIKV é iniciado através de sua adesão à célula hospedeira, a qual é facilitada pela interação da glicoproteína do envelope E2 a receptores específicos expressos na superfície das células alvo, conforme representado na figura 4. Alguns receptores têm sido apontados como participantes no processo de adesão do vírus, tais como o DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3- Grabbing Non-integrin*), CLEC4M (*C-type lectin domain family 4 member M*), sulfato de heparano, laminina, integrinas e o receptor MXRA8 (ZHANG *et al.*, 2018). Após a ligação ao receptor, acontece a penetração do vírus pelo processo de endocitose mediada por receptor e, em seguida, ocorrem alterações conformacionais no envelope viral, devido ao ambiente ácido no interior do endossoma, que permitem a liberação do genoma viral no citoplasma da célula, um processo denominado desnudamento (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Em seguida, dois precursores de proteínas não estruturais são traduzidos a partir do mRNA viral e, então, clivados, o que resulta nas proteínas não estruturais (nsP1-nsP4), as quais apresentam as seguintes funções: (1) nsP1 está envolvida na síntese da fita negativa do RNA viral; (2) nsP2 exibe atividades de RNA helicase, trifosfatase e proteinase, além de estar associada ao desligamento da transcrição na célula hospedeira; (3) nsP3 faz parteda unidade replicase e (4) nsP4 é a RNA polimerase viral (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; SCHWARTZ & ALBERT, 2010).

respectivamente. A montagem do vírion é promovida pela ligação do nucleocapsídeo ao RNA viral e pelo recrutamento das glicoproteínas de envelope associadas à membrana (SCHWARTZ & ALBERT, 2010; ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015). Em seguida, ocorre a liberação da progênie viral e, conseqüentemente, esses vírions podem infectar novas células de forma a estabelecer o processo de infecção.

1.4. A doença causada pelo vírus chikungunya

A infecção pelo CHIKV pode resultar na CHIKF, que é uma doença febril aguda, na maioria dos casos, associada a sintomas como febre, erupção cutânea e artralgia incapacitante (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). A palavra **chikungunya** significa **aquele que se curva** no dialeto africano Makonde e faz referência à postura encurvada associada à artralgia crônica presente nos pacientes infectados (HER *et al.*, 2009). Assim como ocorre com outras doenças virais, a infecção por CHIKV pode ser assintomática (cerca de 30% dos indivíduos infectados) ou produzir um espectro variável de manifestações clínicas, desde formas mais leves até condições graves e incapacitantes (CUNHA & TRINTA, 2017). A CHIKF apresenta um período médio de incubação de três dias e duas fases, aguda e crônica, podem ser observadas nessa doença.

Durante a fase aguda, os pacientes podem apresentar febre alta (>39°C), calafrio, cefaleia, náusea, vômito, fadiga, erupções cutâneas eritematosas e maculopapulares (imagem A, figura 5), dor nas costas, mialgia e artralgia simétrica (a imagem B, figura 5, mostra um paciente com edema nas articulações interfalangianas, o que sugere artralgia). Essa última pode ser intensa e, geralmente, afeta as extremidades, principalmente as articulações dos tornozelos, punhos e falanges. O padrão da artralgia é errático, embora haja uma tendência para que seja mais intensa pela manhã e piore com atividade física mais intensa (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016). Os sinais e sintomas agudos geralmente se resolvem em menos de duas semanas, mas a artralgia pode persistir por mais tempo, sendo este um sintoma clínico importante que pode distinguir a febre causada pelo CHIKV da infecção por outras arboviroses (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). Quando a dor articular persiste além da fase aguda (3 meses ou mais), tem-se a fase crônica da doença. Nessa, a poliartralgia prolonga-se por semanas a anos e, dessa forma, compromete a qualidade de vida do paciente, bem como gera um grande impacto na sociedade em termos de morbidade e produtividade econômica (BURT *et al.*, 2017).



Figura 5: Sinais da febre chikungunya. Na imagem A, o paciente apresenta erupções cutâneas eritematosas e maculopapulares durante a fase aguda da doença, as quais podem envolver mais de 90% da pele. Na imagem B, o paciente apresenta edema importante envolvendo as articulações interfalangeanas proximais e distais bilateralmente, o que sugere artralgia simétrica, a qual pode iniciar na fase aguda e persistir por anos. Adaptado de Burt *et al.*, 2017; Calabrese, 2015.

Embora a CHIKF seja normalmente uma doença autolimitada, os relatos de manifestações graves da doença com complicações têm sido cada vez mais comuns, principalmente nos grupos de risco: neonatos, crianças, idosos, indivíduos imunocomprometidos e pessoas que apresentam morbidades associadas (CONSTANT *et al.*, 2021). As manifestações graves incluem doença gastrointestinal, complicações neurológicas (meningoencefalite e convulsões), complicações oftálmicas (conjuntivite, retinite e uveíte), doenças cardiovasculares, manifestações hemorrágicas e morte (GOUPIL & MORES, 2016; ROHATGI *et al.*, 2014). O aumento no número de complicações da doença se deve a diversos fatores, como a ocorrência de surtos em grande escala, a melhor adaptação viral aos vetores artrópodes urbanos e às novas mutações das linhagens de CHIKV circulantes que aumentam sua virulência e patogenicidade (SCHWAMEIS *et al.*, 2016).

1.5. Patogênese e dor articular associada à infecção pelo vírus chikungunya

Diversos trabalhos têm mostrado que o quadro de dor articular associado à infecção pelo CHIKV pode persistir após a resolução da fase aguda, levando à dor crônica (BRIGHTON *et al.*, 1983; BORGHERINI *et al.*, 2008). Essa, por sua vez, pode se apresentar de diferentes formas: contínua ou intermitente (HUA & COMBE, 2017). Uma análise prospectiva da epidemia ocorrida na ilha La Reunion mostrou que 69% dos pacientes infectados pelo CHIKV adquiriram artralgia persistente (ARROYO-AVILA & VILA, 2015). Da mesma forma, 13,3% dos pacientes de Cingapura e 46% da Índia apresentaram dor persistente nas articulações até 10 meses após a infecção aguda (CHOW *et al.*, 2011; DUPUIS-MAGUIRAGA *et al.*, 2012).

Entretanto, a incidência de artrite crônica atribuída ao surto de CHIKV que ocorreu em 2013 no Caribe e nos Estados Unidos ainda não foi determinada (ROOSENHOFF *et al.*, 2016). Rodriguez-Morales e colaboradores (2016) presumem que 47,6% dos pacientes infectados pelo CHIKV na América Latina irão apresentar artrite persistente. Alguns fatores de risco associados às manifestações reumáticas persistentes da infecção pelo CHIKV têm sido descritos, como o sexo feminino, idade superior a 45 anos, gravidade da dor articular na fase aguda da doença, doença reumática subjacente de base (artrite reumatóide, espondiloartrite, osteoartrite e gota) e níveis aumentados de IgG circulantes (HUA & COMBE, 2017).

A infecção pelo CHIKV é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica. Uma metanálise comparando o perfil de mediadores imunes durante a fase aguda da infecção por CHIKV identificou as citocinas IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-18; além das citocinas com atividade anti- inflamatórias IL-1Ra, IL-4 e IL-10; quimiocinas CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL3, CCL4; Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (FGF) e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) como uma assinatura imune específica, que define a infecção aguda pelo CHIKV (TENG *et al.*, 2015). A quimiocina CCL2, quimioatraente de monócitos e macrófagos, tem sido identificada como um fator fundamental na artrite induzida por alfavírus, a exemplo do vírus ross river (RRV) e CHIKV. Níveis elevados de CCL2 têm sido detectados no soro e na articulação de pacientes na maioria dos estudos clínicos com esses alfavírus (KELVIN *et al.*, 2011; CHAAITANYA *et al.*, 2011; LIDBURY *et al.*, 2008). Ainda, camundongos infectados pelo RRV ou CHIKV que foram tratados com bindarit, um inibidor de CCL2, apresentaram redução do dano articular e musculoesquelético, e também do infiltrado inflamatório para o sítio da lesão. Além disso, o tratamento com bindarit também foi capaz de reduzir a perda óssea induzida por CHIKV (RULLI *et al.*, 2009; RULLI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2015). A depuração do CHIKV durante a fase aguda é seguida pela diminuição da resposta inflamatória por meio de mecanismos reguladores. No entanto, níveis aumentados de diversos mediadores inflamatórios, a exemplo de IFN- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, CCL2 e MMP-2, ainda podem ser detectados até 18 meses após a infecção na articulação de pacientes que desenvolveram sintomatologia persistente, o que sugere uma forte associação entre uma ativação sustentada da resposta imune e o estabelecimento de manifestações clínicas persistentes (DUPUIS-MAGUIRAGA *et al.*, 2012). Neste contexto, Chow e colaboradores (2011) estudaram o perfil de mediadores inflamatórios durante diferentes fases da doença (aguda, de recuperação e crônica) e mostraram que durante

a fase de recuperação inicial, há produção de citocinas e quimiocinas, como IL-2R, IL-4, CCL11, CXCL9, CCL3, HGF, bFGF e G-CSF. A fase de recuperação tardia foi caracterizada pela secreção do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e da quimiocina CCL5. Pacientes que se recuperaram completamente da infecção pelo CHIKV apresentaram níveis elevados de CCL11 (quimiocina que pode bloquear a atividade de CCL2 por competição pelos receptores de quimiocina CCR2, CCR3 e CCR5) e HGF (responsável por suprimir a produção de CCL2) durante a fase de recuperação. Uma vez que os pacientes recuperados apresentam baixos níveis de CCL2 durante a fase de recuperação, sugere-se que a inibição da atividade dos macrófagos está associada à remissão completa da doença (ROSENHOFF *et al.*, 2016). Essa hipótese foi confirmada por um estudo que demonstrou que a inibição do influxo de macrófagos nas articulações de camundongos infectados pelo CHIKV protegeu os animais do desenvolvimento da doença grave (CHEN *et al.*, 2015). Estes dados foram corroborados por diversas pesquisas clínicas que demonstraram que pacientes com sintomas persistentes continham baixos níveis de CCL11 e HGF, enquanto apresentavam altos de GM-CSF (responsável por estimular a ativação de macrófagos) durante a fase de recuperação (DUPUIS-MAGUIRAGA *et al.*, 2012). Dessa forma, a ausência da inibição de macrófagos pode estar envolvida na produção constante de mediadores inflamatórios em pacientes na fase crônica da doença. Outro estudo demonstrou que fibroblastos infectados pelo CHIKV induzem expressão aumentada de prostaglandinas, as quais podem contribuir diretamente para a sensibilização e ativação dos nociceptores nas articulações inflamadas (NG, 2017).

As células T também parecem exercer um papel importante na cronicidade da doença. Durante a fase aguda, células T são recrutadas e ativadas nas articulações e podem se diferenciar em dois fenótipos principais: células com perfil Th1 ou Th2 (BERGER, 2000). Hoarau e colaboradores (2010) mostraram que os pacientes com infecção crônica apresentaram uma resposta Th1 mais acentuada na fase aguda em comparação aos pacientes que se recuperaram da fase aguda. Ainda, durante a fase de recuperação, os pacientes da fase crônica apresentavam níveis elevados de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e IL-12), enquanto que os indivíduos recuperados expressavam majoritariamente altos níveis de citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-10), o que sugere que o perfil de resposta Th2 pode ser necessário para controlar e prevenir a atividade imune crônica exacerbada. Em um modelo experimental utilizando camundongos RAG1^{-/-}, que são deficientes em células T e B, a infecção pelo CHIKV resultou em aumento da carga viral em muitos tecidos, em comparação com camundongos do tipo selvagem (WT), o que sugere que os linfócitos desempenham um papel importante no controle da infecção. No

entanto, análises histopatológicas revelaram presença de sinovite e artrite em ambas as linhagens de camundongos, indicando que a artrite induzida pela infecção não é mediada unicamente pela ativação de linfócitos (HAWMAN *et al.*, 2013).

A resposta inflamatória durante a infecção pelo CHIKV na articulação é semelhante à da artrite reumatóide, com padrão análogo de infiltrado de leucócitos (predominantemente neutrófilos na fase aguda), produção de mediadores inflamatórios e ativação do sistema complemento (BURT *et al.*, 2012; NAKAYA *et al.*, 2012). Os pacientes com dores articulares crônicas podem apresentar níveis elevados de IL-6, TNF, IL-17 e MMP-2, os quais desempenham um papel importante na resposta inflamatória associada aos distúrbios ósseos (CHOW *et al.*, 2011; ROOSENHOFF *et al.*, 2016). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica produzida por vários tipos celulares, incluindo sinoviócitos e osteoblastos. Além disso, a produção de IL-6 após a infecção pelo CHIKV é um fator prognóstico para a gravidade da doença e sua persistência (CHOW *et al.*, 2011). Notavelmente, a IL-6 pode estimular a expressão do Ligante do Receptor do Fator Nuclear Kapa B (RANKL) e promover a reabsorção óssea em diferentes condições inflamatórias, como na artrite reumatóide (HASHIZUME *et al.*, 2008). Noret e colaboradores (2012) demonstraram que a produção de IL-6 por osteoblastos infectados pelo CHIKV estava associada à produção elevada de RANKL. Além da IL-6, TNF e IL-17 também são conhecidos por promover a osteoclastogênese e a destruição das articulações na artrite reumatóide (WEI *et al.*, 2015; PAVLOVIC *et al.*, 2015; OSTA *et al.*, 2015). Ainda, é possível que os níveis elevados de MMP-2 contribuam para as lesões teciduais induzidas pela infecção pelo CHIKV, uma vez que a MMP-2 é uma metaloproteinase que tem como função a quebra de colágeno (ROOSENHOFF *et al.*, 2016).

De forma interessante, alguns trabalhos têm demonstrado que diferentes células do sistema nervoso, como astrócitos, neurônios, micróglia e oligodendrócitos são permissivas à infecção pelo CHIKV. Especificamente, em um modelo *in vitro*, astrócitos infectados pelo CHIKV apresentaram uma elevada expressão de mRNAs para IFN α - β , IL-1 β , IL-12, IL-10, IL-24, TNF, FasL e linfotoxina B, o que culminou na morte dessas células. Em um modelo *in vivo* de infecção intracerebroventricular pelo CHIKV, os camundongos apresentaram uma resposta de astrogliose no SNC (INGLIS *et al.*, 2016; DAS *et al.*, 2015). Sabe-se que os astrócitos são células de extrema relevância no contexto de doenças neuroimunes, como doença de Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), uma vez que regulam as respostas imunes inatas e adaptativas no sistema nervoso central lesado (COLOMBO & FARINA, 2016). Além disso, nos últimos anos tem sido demonstrado que essas células estão intimamente envolvidas na regulação da dor crônica (JI *et al.*, 2019). Após estimulação nociva, os astrócitos se diferenciam em astrócitos reativos, os quais podem ser classificados como A1 ou A2 de acordo com suas funções. Os astrócitos A1 podem secretar neurotoxinas que induzem a morte rápida de

neurônios e oligodendrócitos, enquanto os astrócitos A2 promovem a sobrevivência neuronal e o reparo tecidual (JI *et al.*, 2019). Baseadas nessas informações, alterações na sinalização desse tipo celular podem estar relacionadas ao desenvolvimento da neuropatologia e dor associada à infecção pelo CHIKV.

1.6. Aspectos gerais da dor

De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial dos tecidos. Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) define a dor como um fenômeno multidimensional associado a componentes sensoriais, fisiológicos, cognitivos, afetivos e comportamentais (OMS, 2012). Desta forma, a dor não envolve apenas a transdução de estímulos nocivos, mas também um processamento emocional pelo encéfalo, ou seja, é um fenômeno constituído por dois componentes: sensorial discriminativo, que permite associar aspectos de intensidade e localização de sinais, e outro afetivo emocional que atribui emoção à experiência (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A nocicepção está relacionada com o reconhecimento de sinais pelo sistema nervoso (SN) e abrange os processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta aos estímulos nocivos externos (HELLEBREKERS, 2002). Estes sinais são gerados frente a qualquer estímulo que resulte em lesão tecidual, dentre eles: temperatura (calor ou frio extremos), pressões intensas, irritantes químicos, corrente elétrica ou, até mesmo, movimentos bruscos (SILVA & RIBEIRO-FILHO, 2011). Cada um destes estímulos é detectado por receptores especializados nas células. Por exemplo, a dor e a temperatura são detectadas pelas terminações nervosas livres, o tato é detectado pelos corpúsculos de Ruffini e de Meissner e as ramificações em torno dos folículos pilosos. Já os receptores responsáveis pela propriocepção consciente são os fusos musculares e os órgãos neurotendinosos. Por fim, os receptores para a sensibilidade vibratória são os corpúsculos de Vater Paccini (MACHADO & HAERTEL, 2013). Estes receptores estão representados esquematicamente na figura abaixo.

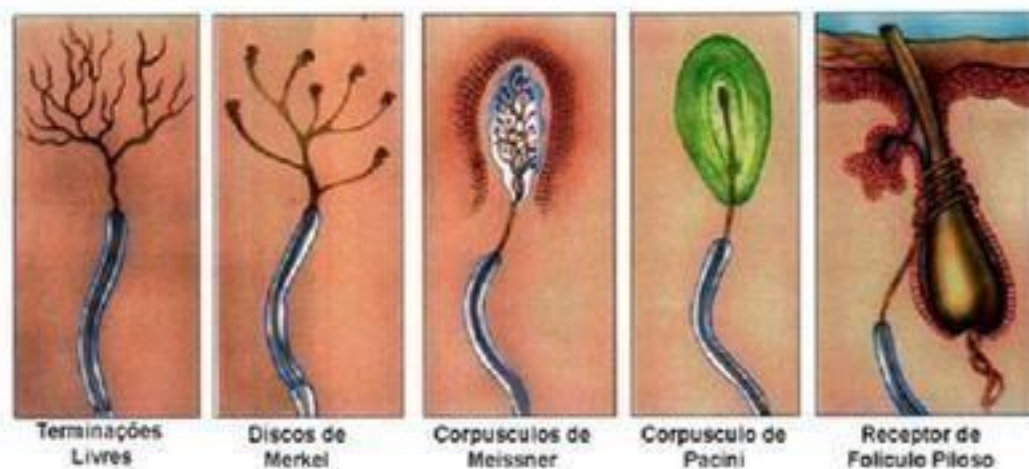


Figura 6: Receptores sensoriais. Retirado de <http://cdn.portalsaofrancisco.com.br/wp-content/uploads/2016/08/palmilha-7.png>.

Mais especificamente, as terminações nervosas livres são receptores sensoriais ligados a sensações mecânicas, térmicas e principalmente dolorosas que se formam na derme em praticamente todo o corpo e ramificam-se até a epiderme (LAMONT *et al.*, 2000). A condução do estímulo nocivo a partir do sistema nervoso periférico (SNP) até o sistema nervoso central (SNC) percorre um longo caminho desde a estimulação periférica, passando pelos gânglios da raiz dorsal (DRG) e chegando à medula espinhal, por onde tem acesso aos centros superiores de processamento. Essa condução é iniciada nas fibras sensoriais aferentes, ou de primeira ordem, que podem ser de dois tipos: fibras A δ e fibras C. As fibras A δ são finas e mielinizadas, possuem pequeno diâmetro (2-5 μ m) e velocidade de condução rápida de 2-25m/s. Estas fibras possuem um alto limiar de estimulação, são responsáveis pela condução rápida da dor, ou seja, da dor aguda e também iniciam as respostas reflexas. As fibras C, por sua vez, são amielínicas, possuem pequeno diâmetro (0,2-1,5 μ m) e velocidade de condução lenta de 2m/s. Assim como as fibras A δ , o seu limiar de ativação também é elevado, são responsáveis pela condução lenta da dor, ou seja, da dor tardia, descrita como dor difusa (JULIUS & BASBAUM, 2001; FURST, 1999; ANWAR, 2016). O corpo celular das fibras sensoriais está presente no DRG, do qual são emitidos dois prolongamentos axônicos, sendo um deles direcionado aos tecidos periféricos e o outro à medula espinhal ou ao tronco encefálico. As fibras sensoriais entram na medula espinhal pelo lado dorsal e se comunicam com neurônios de segunda ordem em regiões medulares bem conhecidas (lâminas de Rexed). A ativação dos neurônios subsequentes conduza informação até o SNC supra-espinhal, onde essa será analisada e interpretada em locais específicos no córtex. Essa informação poderá ser processada e relacionada com vias nervosas neurovegetativas (relacionada aos órgãos) e outros núcleos centrais (sistema límbico, amígdala etc) (JULIUS & BASBAUM, 2001; FURST, 1999; MESSLINGER, 1997; MACHADO & HAERTEL, 2013).

Os impulsos gerados pelos estímulos de temperatura e dor chegam ao encéfalo através de duas vias principais: a via neoespinotalâmica, ou **via clássica** da dor e temperatura, constituída basicamente pelo trato espinotalâmico lateral, envolvendo uma cadeia de três neurônios: I) o neurônio de primeira ordem ou fibra nociceptiva aferente primária, que tem origem periférica nos gânglios espinhais situados nas raízes dorsais (DRGs) com prolongamentos que se projetam para a medula espinhal terminando na coluna posterior, onde faz sinapse com o neurônio de segunda ordem; II) o neurônio de segunda ordem, de onde partem seus axônios que cruzam o plano mediano, se incidem cranialmente para constituir o trato espinotalâmico lateral e ao nível da ponte se unem com as fibras do trato espinotalâmico anterior para constituir o lemnisco medial e termina no tálamo fazendo sinapse com o neurônio de III ordem; III) e o neurônio de terceira ordem localizado no tálamo, no nucleovertebral posterolateral, que se projeta para o córtex cerebral, mais especificamente para a área somestésica do córtex cerebral situada no giro pós-central (áreas 3, 2 e 1 de Broadman), de onde a informação é então processada conforme representado na figura 7 (MESSLINGER, 1997; LAMONT *et al.*, 2000; MACHADO & HAERTEL, 2013). A segunda via, conhecida como paleoespinotalâmica, é constituída por uma cadeia de neurônios em número maior do que a via neoespinotalâmica. Os neurônios de I ordem penetram na medula do mesmo modo que os das vias de dor e temperatura mencionadas anteriormente para a via neoespinotalâmica. Entretanto, os neurônios de segunda ordem ascendem à medula como trato espino-reticular, que juntamente com o trato espinotalâmico lateral, terminam fazendo sinapses com os neurônios de III ordem em vários níveis da formação reticular no SNC. Esses neurônios de III ordem, por sua vez, emitem ramificações para territórios muito amplos do córtex cerebral. Acredita-se que essas projeções estejam mais relacionadas com a ativação cortical do que com a sensação de dor. A diferença mais marcante entre as vias neoespinotalâmica e paleoespinotalâmica é que a segunda não tem organização somatotrópica, sendo responsável por um tipo de dor pouco localizada, dor profunda do tipo crônico, correspondendo à chamada dor em queimação, ao contrário da via espinotalâmica, a qual veicula dores localizadas do tipo dor em pontada (MACHADO & HAERTEL, 2013).

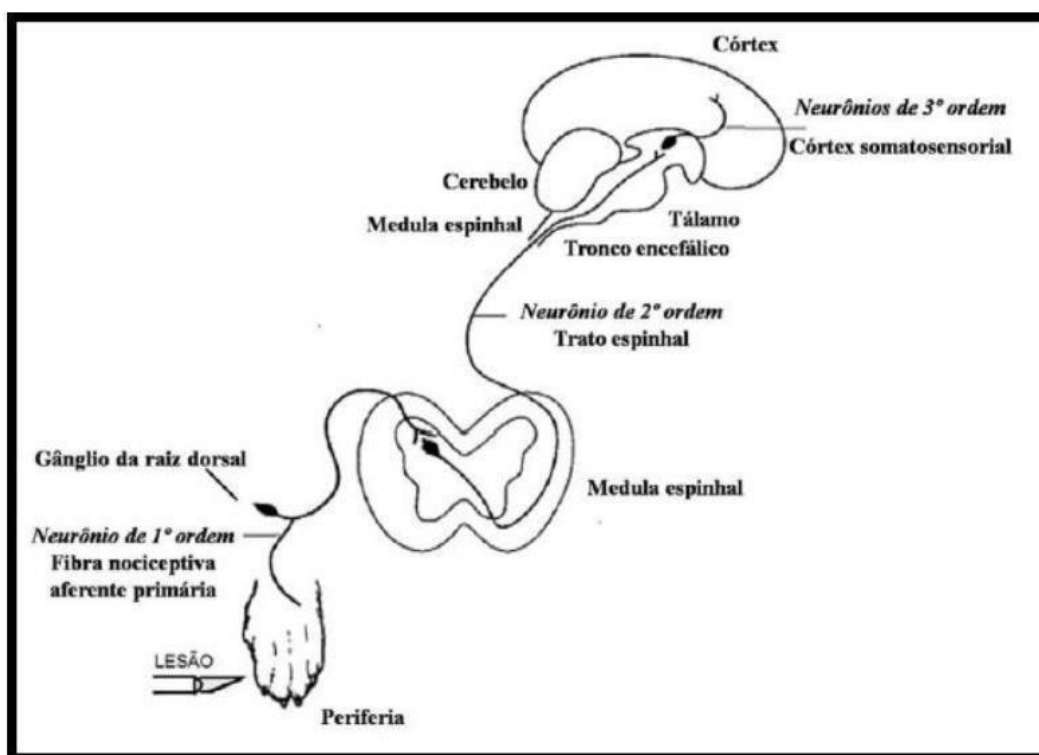


Figura 7: Mecanismo de transmissão do impulso de dor da periferia até o SNC. Adaptado de LAMONT *et al.*, 2000.

Os neurônios, sobretudo através de suas terminações axônicas, entram em contato com outros neurônios através das sinapses, conhecidas como sinapses interneuronais. Entretanto, vale ressaltar que no SNP, as terminações neuronais axônicas podem interagir também com células não neuronais ou efectoras, como células secretoras (glândulas) ou musculares (músculo esquelético, liso ou cardíaco). Quanto à morfologia e ao modo de funcionamento, as sinapses podem ser de dois tipos: sinapses elétricas e sinapses químicas. As sinapses elétricas são raras em vertebrados e exclusivamente interneuronais. Por outro lado, a grande maioria das sinapses interneuronais e neuroefectoras nos vertebrados são sinapses químicas, isto é, a comunicação depende da liberação de mediadores químicos, muitas vezes produtos da lesão ou da inflamação tecidual, conhecidos como neurotransmissores (NT). Uma sinapse química compreende o elemento pré-sináptico que armazena e libera o NT, o elemento pós-sináptico, que contém os receptores para o NT em questão, e uma fenda sináptica, que separa as duas membranas sinápticas. A sensibilização dos nociceptores pelos diferentes estímulos mencionados acima

resulta na liberação de NT, tais como: as aminas vasoativas (serotonina, bradicinina e histamina), o óxido nítrico, prótons, potássio, citocinas, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), adenosina, aminoácidos excitatórios, glutamato, substância P, entre outros (MACHADO & HAERTEL, 2013; BAUSBAUM *et al.*, 2009; JULIUS & BASBAUM, 2001). Estes mediadores interagem com receptores específicos nos nociceptores aumentando a permeabilidade da sua membrana a cátions, o que, conseqüentemente, proporciona alteração no limiar do potencial de ação e sua deflagração com conseqüente propagação do sinal nociceptivo (GUGINSKI, 2008; GRIFFIS *et al.*, 2006; JULIUS & BASBAUM, 2001). Em seguida, ocorre a remoção do NT da fenda sináptica para que haja um perfeito funcionamento das sinapses. Essa remoção pode ser enzimática ou através de bombas de captação para reutilização posterior ou inativação (JULIUS & BASBAUM, 2001; BAUSBAUM *et al.*, 2009).

Devido à ampla variedade de dores e sensações dolorosas, a dor pode ser classificada de acordo com sua fisiopatologia, duração, localização, etiologia e dependência do sistema nervoso simpático (SNS) e da região afetada (LAMONT & TRANQUILLI, 2000; KLAUMANN *et al.*, 2008). Em relação à duração, a dor pode ser classificada em aguda ou crônica. A dor aguda, que tem início súbito e a finalidade de alertar o perigo de uma lesão, consiste em uma dor pontual com durabilidade inferior a três meses (esse período é variável de acordo com o autor), que pode ser resultante de traumas ou associada a doenças, e está relacionada com um processo adaptativo biológico para facilitar o reparo tecidual e cicatricial. Já a dor crônica persiste por um período superior a seis meses após o estímulo inicial e ultrapassa o período usual de recuperação esperado. A manifestação desse tipo de dor pode ser espontânea ou provocada por estímulos externos e a resposta do organismo é sempre feita de forma excessiva em duração, amplitude ou ambas. A dor crônica é associada a uma síndrome debilitante que possui um significativo impacto sobre a qualidade de vida do paciente e se caracteriza por uma resposta reduzida às terapias analgésicas convencionais (LAMONT & TRANQUILLI, 2000; KLAUMANN *et al.*, 2008; CELICH & GALON, 2009).

Contextualizando esse tipo de classificação com a infecção pelo CHIKV, a doença pode evoluir em três fases: aguda, subaguda e crônica. A fase aguda, com duração de até 14 dias, é iniciada após o período de incubação. Após a fase aguda, alguns pacientes evoluem com persistência das dores articulares, o que caracteriza o início da fase subaguda, com duração de até três meses. Quando a duração dos sintomas persiste além dos três meses, têm-se a fase crônica (Ministério da Saúde, 2017).

Outra forma de classificação, que será abordada neste projeto, é a classificação fisiopatológica da dor, a qual é dividida em três tipos: nociceptiva, inflamatória e neuropática (SALTER, 2005). A dor nociceptiva é um mecanismo defensivo crucial aos indivíduos, responsável por advertir danos recentes ou iminentes ao corpo. Ocorre como consequência fisiológica do funcionamento normal do SNP e SNC e é detectada por neurônios sensoriais especializados, os nociceptores, em decorrência da liberação de NT específicos que despolarizam as vias ascendentes de transmissão da dor, a exemplo do glutamato e substância P (SALTER, 2005; DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010). De acordo com a localização dos nociceptores, a dor nociceptiva pode ser subdividida em dor somática e visceral (OMS, 2012). A dor somática é desencadeada pela ativação de nociceptores em tecidos superficiais (pele, mucosa da boca, uretra, entre outros) ou tecidos profundos (tecido ósseo, muscular, conjuntivo e articulações). Cortes e entorses são exemplos de causas de dor somática superficial, enquanto as câibras musculares podem resultar em dor somática profunda. Já a dor visceral é causada pela ativação de nociceptores localizados nas vísceras, como órgãos torácicos e abdominais. A ocorrência desse tipo de dor pode ser devido a quadros infecciosos, distensão de fluido ou compressão de órgãos por tumores sólidos (OMS, 2012). Ambos os tipos de dor usualmente respondem a analgésicos opiáceos (a exemplo da codeína, tramadol, morfina, metadona, fentanil e oxicodona) e não opiáceos (a exemplo dos anti-inflamatórios não esteróides, como o ácido acetilsalicílico e ibuprofeno), com excelente resposta quando a dor é somática e boa resposta quando a dor é visceral (Ministério da Saúde, 2001).

Como demonstrado na figura 8, o estímulo nociceptivo é reconhecido por receptores específicos (TRPV1, TRPA1, TRPM8, entre outros), presentes nos nociceptores (fibras A δ e C). Então, esse estímulo é convertido em impulsos elétricos e transmitido pelos nervos espinhais e cranianos aos neurônios de segunda e terceira ordem no SNC, respectivamente, como já descrito. Vale ressaltar que existem receptores específicos para a transdução de cada estímulo, mas apenas a presença desse transdutor nem sempre confere sensibilidade ao estímulo. Por exemplo, a presença de TRPM8, um transdutor de estímulo frio, não é suficientemente capaz de conferir a sensibilidade ao frio. A sensibilidade ao frio também depende da expressão de canais de K⁺ (GOLD & GEBHART, 2010).

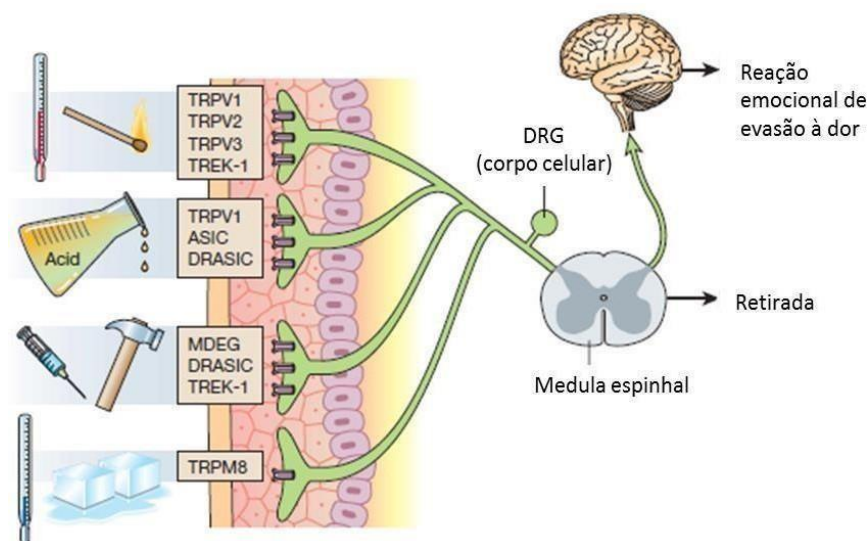


Figura 8: Dor nociceptiva. Adaptado de SCHOLZ & WOOLF, 2002.

A dor neuropática (DN), por sua vez, anteriormente definida como **aquela decorrente de uma lesão ou disfunção do sistema nervoso**, em termos atuais é definida como uma lesão ou doença que gera danos ao sistema somatossensorial, o qual é responsável pela percepção ao tato, temperatura, posição e dor (MIRANDA *et al.*, 2016). Cerca de 6 a 8% da população mundial é afetada por essa condição crônica, sendo mais prevalente em mulheres e idosos (LIU & XIA, 2016; COLLOCA *et al.*, 2017). As etiologias mais comuns associadas à DN são a neuralgia pós-herpética, neuralgia trigeminal, radiculopatia dolorosa, neuropatia diabética, infecções pelo vírus HIV, amputações, hanseníase, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, deficiência de vitamina B12 e quimioterapia (COLLOCA *et al.*, 2017; MEACHAM *et al.*, 2017; ZILIOX, 2017). Diversos fatores afetam negativamente a vida dos pacientes com DN, como ansiedade, insônia, mau humor e depressão, ocasionando um déficit da qualidade de vida do indivíduo. Essa condição também implica em um aumento do número de prescrições medicamentosas e cuidados dos profissionais da saúde, resultado decorrente da falha terapêutica durante o tratamento (COLLOCA *et al.*, 2017; ZILIOX, 2017).

Os sinais e sintomas sensoriais da DN são classificados em positivos e negativos. Os sintomas positivos correspondem às sensações do tipo parestesias e disestesias, sendo dolorosas e geralmente descritas como queimaduras, formigamentos ou picadas. Esses sintomas estão associados à hiperalgesia (aumento da sensibilidade à dor) e alodinia (sensação de dor a um estímulo que normalmente não provocaria a dor). Já os sinais e sintomas negativos são sensações do tipo anestesia tátil, hipostesia térmica e perda de sensação vibratória (NICKEL *et al.*, 2012; ZILIOX, 2017). Geralmente, esses sintomas são descritos como desconfortáveis pelo paciente, mas não dolorosos; isso ocorre devido à lesão direta aos neurônios sensoriais, gerando morte celular e comprometimento da transdução sensorial (HEHN *et al.*, 2012; NICKEL *et al.*, 2012). A dor neuropática pode ser melhorada, mas

frequentemente não é completamente aliviada pela analgesia com opiáceos e não opiáceos, sendo necessária a utilização de fármacos analgésicos adjuvantes, como antidepressivos (amitriptilina, imipramina, citalopran e sertralina), anticonvulsivantes (carbamazepina, gabapentina e fenitoína), anestésicos locais (lidocaína), corticosteroides (dexametasona e prednisona) e antiespasmódicos (hioscina) (Ministério da Saúde, 2001).

Mecanicamente, a lesão dos terminais periféricos das fibras C e fibras A δ resulta em uma alteração da densidade dessas fibras e uma hiperexcitabilidade neuronal, com mudança da expressão gênica e ativação de uma resposta imunológica. A hiperexcitabilidade neuronal pode ser explicada pelo aumento da expressão de isoformas de canais de sódio voltagem dependentes do tipo Nav. Os canais Nav também são expressos nos DRGs originando potenciais de ação anormais ao longo da via nociceptiva. Dessa forma, a alteração da expressão e distribuição dos canais Nav ao longo dos neurônios nociceptivos são responsáveis pela produção de potenciais de ação de origem espontânea. Esse fenômeno é chamado de atividade ectópica de potenciais de ação e explica a sensação dolorosa que ocorre na DN na ausência de qualquer estímulo externo. Esses canais são ativados após a detecção sensorial de estímulos pelos receptores do tipo TRP (HEHN *et al.*, 2012; GARCIA-LARREA, 2014; GEIS *et al.*, 2017; MEACHAM *et al.*, 2017). Além dos canais Nav, sugere-se que a atividade dos canais de Ca²⁺ voltagem dependentes também seja importante na modulação da transmissão sináptica (FORNASARI, 2012). Adicionalmente, observa-se na DN periférica uma diminuição da ativação e expressão de canais de potássio do tipo Kv, que são canais repolarizantes e reguladores da descarga elétrica, o que resulta em uma diminuição das correntes de K⁺ e, conseqüentemente, um aumento da excitação dos nervos sensoriais. Alguns autores também descrevem que a produção de vários mediadores inflamatórios, como TNF, IL-1 β , IFN- γ e PGE₂, por células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos e mastócitos), é responsável por manter a sensibilização das fibras nervosas e, conseqüentemente, um prolongamento da sensação dolorosa, tanto na região da lesão do nervo, quanto ao nível do corpo celular dos DRGs (PERKINS & TRACEY, 2000; MORIN *et al.*, 2007, MEACHAM *et al.*, 2017). Ainda, as neurotrofinas (NGF) produzidas por essas células são responsáveis por ativar quinases e alterarem a expressão de transdutores (particularmente TRPV1 e canais de sódio tipo Nav), o que aumenta a sensibilização dos neurônios periféricos (HEHN *et al.*, 2012). Outro fato importante é a expressão de receptores adrenérgicos nas fibras nociceptivas, o que gera respostas a norepinefrina circulante (GARCIA-LARREA, 2014). No entanto, os mecanismos envolvidos com as alterações nas vias nociceptivas, a nível medular e nos DRGs, não estão bem descritos para estados dolorosos crônicos causados por infecções. Este é um ponto importante, uma vez que em estados infecciosos, como na infecção pelo CHIKV, a produção de mediadores inflamatórios é essencial para ativar respostas efetoras que culminam na eliminação do patógeno.

A hiperexcitabilidade periférica pode ocasionar a sensibilização das vias nociceptivas da medula espinhal, gerando uma sensibilização central (NICKEL *et al.*, 2012). A descarga contínua de fibras aferentes periféricas permite a liberação de NT, como glutamato (NICKEL *et al.*, 2012; GARCIA-LARREA, 2014). O glutamato está envolvido na transmissão da dor, por meio de 3 receptores: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiônico (AMPA), N- metil- aspartato (NMDA) e os receptores de glutamato acoplados à proteína G. Os peptídeos CGRP e substância P, que são liberadas nos terminais das fibras nociceptivas, revertem a inibição fisiológica dos receptores NMDA que normalmente são bloqueados por íons Mg^{2+} . Dessa forma, ocorre uma potencialização dos estímulos nocivos (NICKEL *et al.*, 2012). Alterações de várias cascatas de sinalização celular participam do processo de sensibilização central, como a ativação da proteína quinase C, via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), vias de sinalização de óxido nítrico. Essas vias também estão envolvidas no prolongamento da sensação dolorosa (NICKEL *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm demonstrado que as modificações funcionais não são apenas um processo intrínseco dos neurônios, mas que neste fenômeno as células da glia, presentes tanto no SNC (células da glia na medula espinhal) quanto no SNP (células satélites do DRG), desempenham um importante papel. As células da glia (microglia, astrócitos e oligodendrócitos) tem função de fornecer suporte, nutrição e proteção aos neurônios. A ideia principal é que durante o processo de instalação da nocicepção, as células da glia são responsáveis pela criação de um ambiente inflamatório na medula espinhal, bem como nos DRGs, induzindo e mantendo estados dolorosos crônicos (MILLIGAN & WATKINS, 2009).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ativação das células gliais da medula espinhal e das células satélite nos DRGs e sua contribuição para a gênese da dor crônica. As evidências sugerem que durante os processos de lesão tecidual, a constante estimulação das vias nociceptivas leva a liberação intensa de NT excitatórios (glutamato, substancia P, ATP) na medula espinhal e nos DRGs, os quais seriam responsáveis pela ativação das células da glia (MILLIGAN & WATKINS, 2009). Entre os principais mediadores inflamatórios descritos como participantes do processo de desenvolvimento e manutenção da DN estão as citocinas TNF, IL-1 β e IFN γ . Ainda, existem evidências que a ativação de células da glia por CCL2 e CCL5 (via receptores de quimiocina) pode estar também relacionada com o desenvolvimento da DN. Como descrito acima, a quimiocina CCL2 possui importante participação no processo de infecção pelo CHIKV. De forma geral, todos estes mediadores culminariam na expressão da enzima ciclooxigenase-2 e produção de PGE2. Muitos autores ainda atribuem a liberação destes mediadores com a manutenção da sensibilização dos neurônios nociceptivos periféricos na DN (ABBADIE *et al.*, 2003; MILLIGAN & WATKINS, 2009; KIGUCHI *et al.*, 2010).

Por fim, a dor inflamatória é resultado de uma resposta inflamatória aguda em um tecido lesionado que pode culminar em aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar de dor a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca dor (LINLEY *et al.*, 2010). Sabe-se que a expectativa de vida é reduzida entre 3 a 18 anos em 80% dos pacientes diagnosticados com dor inflamatória (NAZEMIAN *et al.*, 2016). Esse tipo de dor também pode influenciar negativamente a realização de atividades de vida diária, devido à redução do funcionamento e mobilidade da área acometida (COBOS *et al.*, 2012). A dor de origem inflamatória resulta, basicamente, da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da sensibilização direta de nociceptores através de mediadores inflamatórios, a exemplo de IL-6, IL-1 β e TNF (CUNHA *et al.*, 2005). Como representado pela figura 9, esses mediadores podem ser liberados diretamente pelas células danificadas pelo trauma tecidual ou por células da imunidade inata ou adaptativa que migram ao tecido lesionado e são fundamentais para o desenvolvimento das respostas inflamatórias e hiperalgésicas (CUNHA *et al.*, 2005). No que se refere à dor, os mediadores inflamatórios durante a resposta inflamatória podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hipernociceptivos intermediários e hipernociceptivos finais. Os mediadores intermediários, tais como TNF, IL-1 β e IL-8, são liberados nas fases iniciais da inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores. Já os mediadores finais, tais como endotelina, substância P, prostaglandinas e aminas simpáticas, interagem diretamente com seus receptores específicos, presentes nos neurônios aferentes primários, provocando sua sensibilização. Esses mediadores, por sua vez, agem, preferencialmente, em receptores neuronais metabotrópicos de fibras C, desencadeando a ativação de mensageiros secundários, tais como AMP cíclico (cAMP), proteína kinase A (PKA) e proteína kinase C (PKC). Por exemplo, a subsequente fosforilação do canal de sódio voltagem-dependente Nav 1.8 e a inibição de canais de potássio voltagem-dependentes são responsáveis pela queda dos limiares de ativação neuronais, aumentando a excitabilidade de membrana (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; FERREIRA, 1980).

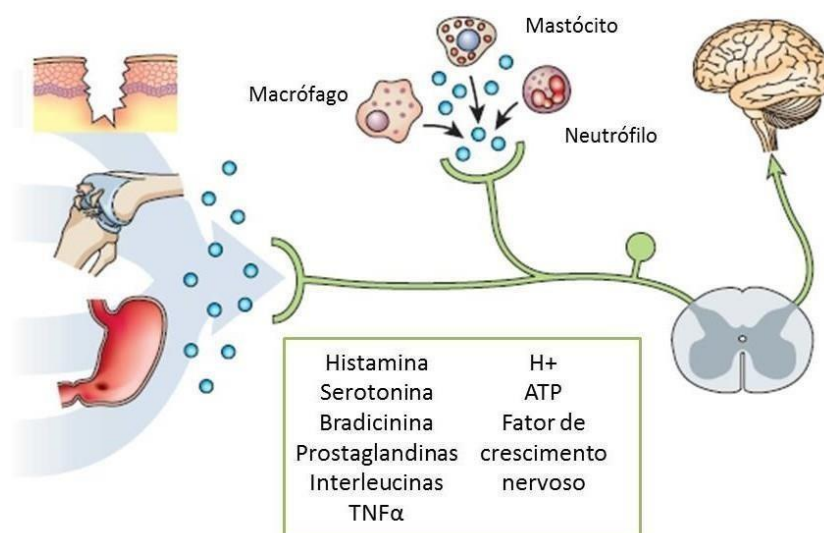


Figura 9: Dor inflamatória. Adaptado SCHOLZ & WOOLF, 2002.

Dessa forma, a redução da dor inflamatória envolve a inibição da síntese ou acúmulo de componentes inflamatórios. Um exemplo são os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que reduzem a dor inflamatória e hiperalgesia por inibição de ciclooxygenases (COX-1 e COX-2) envolvidas na síntese de prostaglandinas. Outra forma de tratamento da dor inflamatória é a inibição das ações de agentes inflamatórios no nociceptor como, por exemplo, o NGF, utilizando anticorpos neutralizantes (Anti-NGF) (BASBAUM et al., 2009).

1.7. Principais mediadores inflamatórios envolvidos no processo nociceptivo

Como descrito no tópico anterior, diferentes mediadores inflamatórios contribuem significativamente tanto para a dor neuropática quanto para a dor inflamatória, uma vez que atuam a nível periférico e central desempenhando papéis diferentes e importantes na gênese e manutenção da dor.

As citocinas liberadas por células imunes e células não neuronais (a exemplo das células epiteliais) podem atuar diretamente nos neurônios nociceptores para sensibilizar as vias de dor, a exemplo de TNF, denominada pró-algésica. O TNF medeia a sensibilização à dor principalmente através do receptor TNF 1 (TNFR1) e diversos trabalhos têm demonstrado isso. Em um modelo murino de dor inflamatória induzida por carragenina, a hiperalgesia mecânica foi marcadamente reduzida em camundongos com deficiência de TNFR1. Em modelos de artrite, a neutralização sistêmica do TNF com etanercept atenuou a hipersensibilidade mecânica e térmica nas articulações afetadas (VON BANCHET *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2020). De forma interessante, a aplicação de TNF nos corpos celulares dos DRGs induz um aumento da excitabilidade neuronal (BARAL *et al.*, 2019). No SNC, a micróglia e astrócitos também liberam TNF, o qual atua nas vias neurais para modular a sinalização da dor (JI *et al.*, 2014).

Além disso, foi demonstrado que o TNF aumenta as frequências pós-sinápticas excitatórias e a transmissão sináptica no corno dorsal espinhal após injeção intratecal (ZHANG *et al.*, 2011). Ainda, o bloqueio do TNF em pacientes com artrite reumatóide também reduziu significativamente a dor, proporcionando não apenas alívio sintomático, mas também alterações do sinal nociceptivo no tálamo e no córtex somatossensorial envolvidos na percepção da dor (HESS *et al.*, 2011).

Durante a inflamação, diferentes mediadores lipídicos são liberados e também desempenham um papel importante na sinalização da dor. As prostaglandinas e os leucotrienos direcionam a sensibilidade à dor, enquanto lipídeos pró-resolutivos, como resolvinas e maresinas, têm ação analgésica (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017). De forma interessante, os efeitos analgésicos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) atuam justamente através do bloqueio das enzimas ciclooxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2), responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em precursores prostanóides, os quais são posteriormente convertidos em prostaglandinas e tromboxanos. Cinco prostanóides bioativos são gerados por essa via (prostaglandina E2 (PGE2), PGI2, PGD2, PGF2 α e tromboxano) e a sensibilização dos terminais nervosos periféricos por prostaglandinas é uma das principais causas de dor inflamatória (BARAL *et al.*, 2019). Ferreira (1972) mostrou que a injeção de PGE2 em voluntários humanos causou uma hiperalgesia duradoura ou uma sensibilização a outros estímulos químicos ou mecânicos. Neste artigo, ele demonstrou fortemente a ideia de que uma prostaglandina sensibilizou as terminações nervosas sensoriais para a atividade nociceptiva. (FERREIRA *et al.*, 1972). Além disso, sabe-se que os terminais nociceptivos periféricos expressam receptores acoplados à proteína G para vários prostanóides: EP1– EP4 (que se ligam a PGE2), DP1 e DP2 (que se ligam à PGD2) e o receptor da prostaciclina (que se liga a PGI2). A ativação dos receptores DP1, EP2, EP4 e IP medeia um aumento nos níveis de cAMP neuronal, enquanto a ativação do receptor EP1 induz a mobilização de cálcio (CHEN *et al.*, 2013). A inflamação periférica também induz a expressão de COX-2 nos neurônios do SNC, levando ao acúmulo de níveis de PGE2 no líquido cefalorraquidiano e à modulação da dor por mecanismos centrais (SAMAD *et al.*, 2001). Enquanto o EP1 – EP4 aumenta a atividade do TRPV1 por meio da sinalização dependente da proteína quinase C (PKC) e A (PKA) durante a sensibilização periférica, a PGE2 espinhal aumenta a excitabilidade neuronal espinhal através do EP2 (BARAL *et al.*, 2019).

Uma outra molécula importante no processo de algisia é a bradicinina, um peptídeo endógeno gerado a partir da proteólise do sistema cinina-caliceína que participa de variados eventos fisiológicos e na patogênese de diferentes doenças. A bradicinina excita/sensibiliza os neurônios sensoriais primários e provoca a liberação de neuropeptídeos, como a substância P, a neuroquinina A e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Dessa forma, a bradicinina tem sido amplamente associada à hiperalgesia inflamatória e neuropática e inibidores desse

peptídeo têm sido estudados como potenciais terapias para várias condições clínicas. Além disso, a bradicinina também desempenha papéis importantes na vasodilatação e na resposta ao estresse oxidativo. De forma geral, as cininas são produzidas no plasma humano e em tecidos corporais específicos através da clivagem de precursores de cininogênio de alto peso molecular por calicreínas plasmáticas e teciduais, respectivamente. As cininas são altamente inflamatórias e podem ser ainda mais degradadas em peptídeos inativos pelas cininases. A clivagem diferencial dos cininogênios de alto peso molecular gera espécies distintas de cininas (a exemplo da bradicinina) que são reconhecidas por dois receptores de bradicinina, B1 e B2. O primeiro receptor (B1) está ausente na maioria dos tecidos corporais, mas é facilmente induzível e pode ser detectado quando a inflamação está presente. Já o segundo (B2) é considerado um receptor constitutivo da bradicinina e é altamente expresso em todos os tecidos corporais. Os receptores B2 geralmente estão relacionados a dor aguda, enquanto os receptores B1 estão relacionados a dor da inflamação crônica (GRASTILLEUR *et al.*, 2013; FALSETTA *et al.*, 2016; BARAL *et al.*, 2019).

Dessa forma, é notável que vários mediadores inflamatórios contribuem significativamente para a dor neuropática e inflamatória, uma vez que atuam periféricamente nos terminais dos nociceptores para conduzir a sensibilização periférica ou modulam a neurotransmissão e os circuitos da dor na medula espinhal para conduzir a sensibilização central.

2. JUSTIFICATIVA

Os dados epidemiológicos da infecção pelo CHIKV no Brasil são alarmantes e, juntamente com a dengue, colocam a febre chikungunya como uma das arboviroses mais importantes que acometem o homem na atualidade. Essa emergência se deve principalmente à elevada taxa de morbidade da população acometida, devido à indução da artralgia crônica e dor persistente nestes pacientes, o que resulta em uma redução da produtividade da população trabalhadora, queda massiva da qualidade de vida dos indivíduos acometidos e grande impacto econômico aos órgãos públicos de saúde. O tratamento da doença é limitado, visto que ainda não existem fármacos específicos e/ou vacina aprovada. O tratamento é de suporte sintomático, com uso de medicamentos anti-inflamatórios, analgésicos (opióides, não opióides e adjuvantes), hidratação e repouso. Com relação à forma de prevenção, assim como nos casos da infecção por outros arbovírus, o método mais eficaz consiste em evitar reprodução e propagação do mosquito vetor.

Estudos recentes têm sido conduzidos em sistemas *in vivo* e *in vitro* visando elucidar a fisiopatologia da infecção pelo CHIKV, a exemplo do tropismo viral, perfil de replicação viral, células e mediadores inflamatórios envolvidos na resposta do hospedeiro frente à infecção, nas fases aguda e crônica da doença. Até o momento, as hipóteses para o desenvolvimento da dor articular associada à infecção pelo CHIKV são baseadas em uma resposta inflamatória exacerbada sustentada associada a replicação do vírus ou persistência de componentes virais, como por exemplo o RNA viral, nos tecidos do hospedeiro. De maneira semelhante à patogênese da artrite reumatóide, a resposta imune prolongada e exacerbada pode causar danos teciduais ou promover osteoclastogênese e, então, induzir a reabsorção óssea. No entanto, apesar das evidências fornecidas por alguns estudos para esta hipótese, há uma grande quantidade de informações sobre a patogênese da artrite crônica induzida por CHIKV que ainda não foram elucidadas (ROSENHOFF et al., 2016). Os mecanismos periféricos e centrais envolvidos com as alterações nas vias nociceptivas, a nível medular e nos DRGs, durante a infecção pelo CHIKV permanecem por ser elucidados. Deste modo, novos estudos são necessários para compreender os diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor induzida pelo CHIKV.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar os mecanismos e mediadores envolvidos na gênese e manutenção da hipernocicepção induzida pela infecção pelo vírus chikungunya (CHIKV).

3.2. Objetivos específicos

- 1) Caracterizar a hipernocicepção induzida pelo CHIKV em camundongos selvagens da linhagem C57BL/6;
- 2) Caracterizar o efeito de drogas com efeito analgésico na fase aguda e persistente da hipernocicepção induzida pelo CHIKV no modelo:
 - a. Morfina;
 - b. Pregabalina;
 - c. Dexametasona;
 - d. Naproxeno;
 - e. Celecoxibe.
- 3) Caracterizar o perfil de expressão de mediadores inflamatórios no DRG de camundongos infectados pelo CHIKV;
- 4) Avaliar o papel do TNF durante a doença e na gênese e desenvolvimento da hipernocicepção induzida pelo CHIKV;
- 5) Avaliar o papel de IL-6 no desenvolvimento da hipernocicepção induzida pelo CHIKV;
- 6) Avaliar o papel dos receptores de bradicinina no desenvolvimento da hipernocicepção induzida pelo CHIKV;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Vírus

Neste trabalho, foi utilizada uma linhagem Asiática do vírus chikungunya isolada de uma amostra clínica de um paciente virêmico, a qual foi gentilmente cedida pelo prof. Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, sob número de acesso BHI3762/H 804917, e mantida no laboratório Interação Microrganismo Hospedeiro - Departamento de Microbiologia (UFMG).

4.2. Animais e células

Neste trabalho, foram utilizados camundongos do tipo “selvagem” (WT) da linhagem C57BL/6 com 4 semanas de idade adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, Minas Gerais. Além disso, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 geneticamente modificados deficientes para: (1) o receptor 1 (p55) do TFN (TNFRp55^{-/-}); (2) os receptores de cininas, B1 ou B2 e (3) o receptor da interleucina IL-6 (IL-6R^{-/-}), todos com 4 semanas de idade, os quais foram adquiridos do Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação claro e escuro de 12 horas, ração e água sem restrições. A infecção dos camundongos foi realizada pela administração intraplantar (i.pl.) (30ul) de uma solução de sobrenadante de cultura (C6/36) contendo 1,0x10⁶ PFU de CHIKV. Os camundongos controle receberam o mesmo inóculo contendo apenas o sobrenadante de cultura (C6/36). Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 230/2017.

4.3. Fármacos

Neste trabalho, foram utilizados fármacos de diferentes classes terapêuticas. Para todos os fármacos, utilizamos dois esquemas de tratamento diferentes: No primeiro esquema (D0-2), os camundongos foram tratados nos dias 0, 1 e 2 da infecção, enquanto no segundo (D7-9), os camundongos foram tratados nos dias 7, 8 e 9 após a infecção.

- a. Agonista de receptores opioides: Morfina (5mg/kg, i.p. 1 vez ao dia);
- b. Análogo de GABA, anticonvulsivo e antiepiléptico: Pregabalina (30mg/kg, i.p. 1 vez ao dia);
- c. Corticosteroide: Dexametasona (2mg/kg, i.p. 1 vez ao dia);
- d. Inibidor não seletivo da ciclooxigenase: Naproxeno (60mg/kg, i.p. 1 vez ao dia);
- e. Inibidor seletivo da ciclooxigenase 2: Celecoxibe (15mg/kg, i.p. 1 vez ao dia ou intratecal 5ug i.t. 1 vez ao dia);
- f. Proteína de fusão do receptor p75 do TNF: Etanercept (25mg/kg, i.p. 1 vez ao dia ou intratecal 5ug i.t. 1 vez ao dia).

4.4. Propagação e concentração do vírus

O CHIKV foi propagado em células C6/36 (*Aedes albopictus* clone C6/36) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número 0343 mantidas em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), com atmosfera umidificada a 37°C na presença de meio de cultivo Leibowitz L-15 suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 2% Soro Fetal Bovino – por 5-7 dias.

Os sobrenadantes obtidos das culturas infectadas foram centrifugados a 600g por 10min para retirada dos fragmentos celulares. Subsequentemente, o sobrenadante foi adicionado na coluna de concentração viral (Vivacell 100 centrifugal concentrator – Sartorius, Alemanha) e as partículas virais foram concentradas pelo auxílio de centrifugação (2000g por 10 min). O volume que ultrapassou a membrana foi descartado e o sobrenadante que permaneceu no concentrador foi aliquoteado e armazenado em freezer -80°C para uso posterior. O título viral, expresso em unidades formadoras de placa (PFU)/mL, das amostras foi obtido através do ensaio de formação de placas em células permissivas da linhagem VERO, como descrito no item 4.5.

4.5. Determinação da carga viral

Para determinar a carga viral nos estoques virais e nas amostras de soro e tecidos dos camundongos infectados pelo CHIKV, foi empregada a técnica de titulação viral por ensaio de formação de placas de lise como descrito por BAER & KEHN-HALL, 2014.

Brevemente, células da linhagem VERO (células derivadas de rim do macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) também provenientes do BCRJ sob número 0245, foram crescidas em meio RPMI 1X, suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% Soro Fetal Bovino. As células foram tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas em placas de 6 ou 12 poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço e 5×10^5 células/poço, respectivamente. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por cerca de 24 horas, quando seus poços

apresentavam uma monocamada de células com uma confluência de 85 a 90%.

Os estoques virais e as amostras de soro obtidas dos camundongos infectados foram diluídos serialmente em meio RPMI. As amostras coxim plantar, tornozelo, joelho, quadríceps, baço, fígado e cérebro foram pesadas, maceradas com auxílio de gral e pistilo de porcelana estéreis e diluídas serialmente, seguindo a proporção de 10% peso/volume, em meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB. As amostras de linfonodo poplíteo (LNP), nervo esquiático, medula espinhal e os gânglios da raiz dorsal L3, L4 e L5 ipsilaterais à infecção serão maceradas entre lâminas estéreis e diluídas em 500mL de meio RPMI. A cada poço de uma placa será adicionado 400 μ L (para placa de 6 poços) ou 300 μ L (para placa de 12 poços) de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma dada amostra (tecido) ou diluições de (10^{-2} a 10^{-4}) para o soro. O controle de células será um poço não inoculado, ao qual será acrescentado apenas o meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB nos mesmos volumes. As placas serão incubadas por um período de uma hora a 37°C (período de adsorção viral) durante o qual serão gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio será retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com meio RPMI. Em seguida, será adicionado meio DMEM contendo 1.6% de carboximetilcelulose, antibióticos e 2% de SFB. As placas serão incubadas a 37°C por quatro dias, período no qual os efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio invertido. Após este período, as mesmas serão fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em H₂O deionizada, para a determinação do título das amostras, os quais serão expressos em PFU/g ou PFU/mL (Unidades Formadoras de Placa).

4.6. Medida do edema plantar

Com a utilização de um paquímetro, foi realizada a medida do edema plantar dos animais infectados pelo CHIKV. As medidas foram realizadas previamente à injeção do vírus, para obtenção dos níveis basais de cada animal, e nos dias 1, 3, 7 e 14 após a infecção. A medida do volume da pata foi realizada sempre duas vezes pelo mesmo operador e a média destes valores foi utilizada para a computação dos dados. Os valores das medidas foram expressos na unidade de volume milímetro (mm). Para controle do experimento, foram utilizados camundongos que receberam injeção via i.pl. contendo apenas PBS.

4.7. Medida da hipernocicepção articular

A avaliação de hipernocicepção, ou medida de dor em animais de experimentação, foi realizada por diferentes testes: filamentos de Von Frey, Von Frey eletrônico e teste de Hargreaves.

O teste de medida de pressão eletrônica modificado em camundongos, ou simplesmente von Frey eletrônico, foi realizado da seguinte forma: Resumidamente, os camundongos foram colocados em caixas de acrílico sobre uma tela de suporte metálica pelo período de 15 a 30 minutos (período de adaptação). Neste experimento, foi utilizado um medidor de pressão eletrônico que visa avaliar a transmissão do estímulo através de um sensor (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O teste consiste na aplicação de uma ponteira romba de $0,5\text{mm}^2$ na parte posterior da pata dos animais infectados pelo CHIKV ou nos animais controle (PBS), onde a força perpendicular aplicada na área central da superfície plantar induz a flexão da articulação do joelho seguido da resposta de retirada da pata pelo animal. A intensidade da pressão foi automaticamente recordada pelo sensor e os valores para a resposta foram obtidos após três medidas, antes e após a infecção de cada animal individualmente. A hipernocicepção articular foi avaliada diariamente após a inoculação do CHIKV. Os resultados foram expressos como média, como descrito por Cunha e colaboradores (2004).

O teste de Hargreaves, por sua vez, foi descrito 1988 e consiste no aquecimento, por meio de uma fonte radiante de luz infravermelha, da região central da planta da pata traseira de camundongos. O comportamento nociceptivo foi avaliado como a sensibilidade ao calor (hipernocicepção térmica), determinada pela latência de retirada da pata do raio de luz. Contudo, o limite máximo permitido para exposição da pata ao raio infravermelho foi de 15 segundos, no sentido de evitar danos teciduais. Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico individuais posicionados sobre uma superfície de vidro especial, que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor. Cinco minutos foram utilizados para adaptação dos animais ao ambiente. Após esse período, a fonte de luz infravermelho, colocada sob cada uma das patas traseiras do animal, foi acionada juntamente com um cronômetro eletrônico, até que o animal

retirou a pata e a fonte de luz e o relógio pararam automaticamente. Duas ou três medidas foram realizadas com um intervalo de tempo de 5 a 10 minutos entre as mesmas. As medidas de latência de retirada da pata foram expressas como avaliações percentuais relativas às patas-controle (contralaterais) em cada tempo de observação.

4.8. Quantificação indireta de neutrófilos (MPO)

O acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi avaliado pelo ensaio indireto através da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para tanto, fragmentos do coxim plantar dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a -20°C . Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO_4 ; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 - Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão Na_3PO_4 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v e re-homogeneizado. Alíquotas de 1mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 10.000rpm e os sobrenadantes coletados.

A atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450nm) usando tetramethylbenzidine (1.6mM) e H_2O_2 (0.5mM) para a medição das alterações da densidade óptica (OD). Os resultados foram expressos como OD (Souza *et al.*, 2004).

4.9. ELISA

Para dosagem de citocinas e quimiocinas, fragmentos do coxim plantar foram homogeneizados em solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 0,1mM benzethonium chloride; 10mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) a -20°C .

As amostras foram analisadas na diluição 1:2 para citocinas e 1:3 para quimiocinas em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, como previamente padronizado em nosso laboratório. Foram utilizados kits de anticorpos (R&D Systems, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4) e a sensibilização ocorreu durante 18h a 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 18h. Os poços foram então lavados e o anticorpo de detecção adicionado pelo período de 2h. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem – 1:4000) e revelada com OPD (o-phenylenediamine dihidrocloride – Sigma-Aldrich, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492nm. Os ensaios apresentam uma sensibilidade de 8-16pg/ml.

4.10. Análise histopatológica

O membro inferior direito de camundongos, contendo o músculo quadríceps, joelho e o tornozelo, foi coletado ao longo da cinética da infecção e fixado em formol 10%v/v por no mínimo 2 dias. Em seguida, os tecidos permaneceram em uma solução de EDTA 14%p/v, durante aproximadamente 40 dias, com troca da solução a cada 3 dias, para a sua desmineralização. Uma vez desmineralizados, os tecidos foram processados, incluídos em parafina, cortados, montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), como descrito por Costa e colaboradores (2015). Foram avaliados os seguintes parâmetros nos cortes corados por H&E: a gravidade da hiperplasia sinovial (0: sem alterações; 1: hiperplasia focal; 2: hiperplasia extensa; 3: hiperplasia generalizada), intensidade de infiltrado inflamatório (0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso; 4: generalizado), hiperemia (0: ausente; 1: presente), presença de células inflamatórias no espaço sinovial (0: ausente; 1: presente), perda da arquitetura tecidual (0: ausente; 1: presente). Após a análise, as pontuações foram somadas, podendo totalizar 10 pontos.

4.11. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão médio (EPM) por grupo de 3 ou 5, assim como definido no cálculo amostral aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t não paramétrico ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM (GraphPad Software, EUA). Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A padronização do modelo murino de infecção pelo CHIKV em nosso laboratório está descrita no artigo **Tumor necrosis factor plays a deleterious role in the pathogenesis of chikungunya virus infection** (MOREIRA, T. P. *et al.*), o qual está em submissão na revista *Immunology*. De forma geral, os camundongos C57BL/6 machos de 4 semanas de idade foram infectados via intraplantar com $1,0 \times 10^6$ PFU do CHIKV e diversos parâmetros clínicos, inflamatórios e virais foram avaliados durante a cinética da infecção: 1, 3, 7, 14 e 21 dias.

Nossos resultados demonstraram que a infecção intraplantar pelo CHIKV induz hipernociceção mecânica prolongada nos camundongos. Ainda, foi observada a presença de carga viral viável em diferentes órgãos-alvo, como pata, articulação do tornozelo, linfonodo poplíteo (LNP), joelho ipsilateral, baço e soro, nos primeiros tempos após a infecção (1 e 3 dias). Com relação aos parâmetros inflamatórios, foi demonstrado que a infecção induz um intenso influxo de neutrófilos na pata e a produção local de diferentes mediadores inflamatórios, como TNF. De forma geral, nosso modelo culmina em um dano tecidual generalizado, evidenciado pela presença de importante infiltrado celular e intensa perda da arquitetura tecidual no 7º dia após a infecção. Contudo, o nosso modelo se mostrou autorresolutivo, uma vez que no 14º dia, a arquitetura do tecido se restabeleceu.

5.1. A infecção intraplantar pelo CHIKV em camundongos imunocompetentes induz hipernociceção mecânica e térmica.

Um parâmetro clínico importante e característico da CHIKF, mas não mostrado anteriormente em outros modelos experimentais disponíveis na literatura, é a dor, ou hipernociceção em animais. Assim, a fim de avaliar capacidade do CHIKV em induzir hipernociceção, camundongos C57BL/6 machos com 4 semanas de idade foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU do CHIKV via intraplantar (i.pl) ou intra-articular (i.a.) e a sensibilidade mecânica e térmica desses animais foi avaliada por até 21 dias (Figura 10).

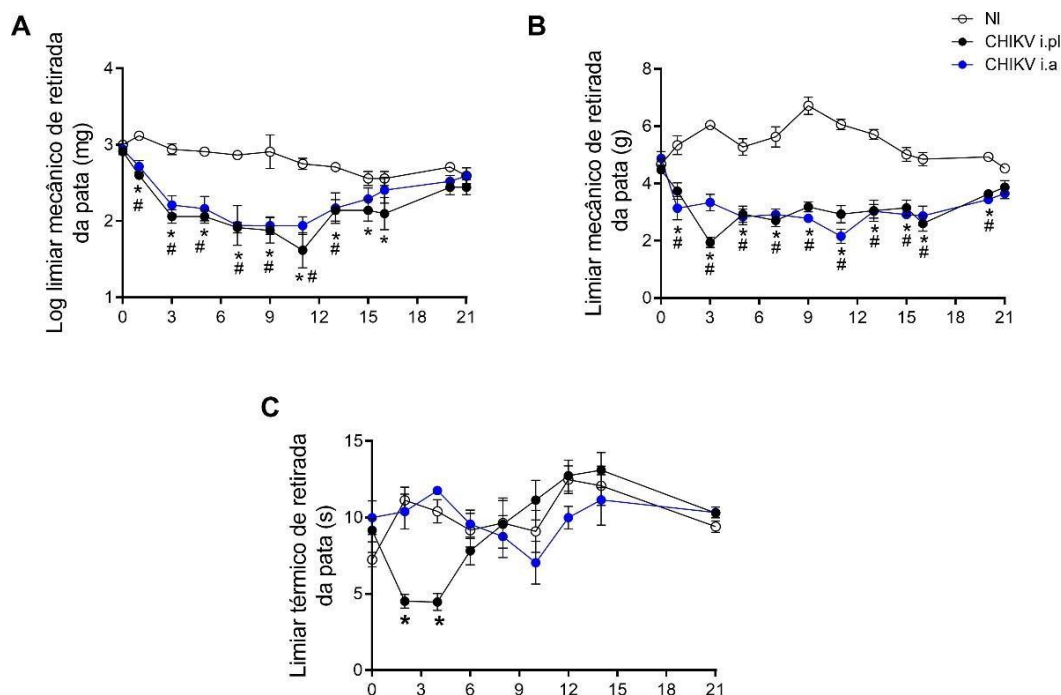


Figura 10: A infecção via intraplantar pelo CHIKV em camundongos imunocompetentes induz hipernociceção mecânica e térmica, ao passo que a inoculação do vírus por via intra-articular altera o limiar mecânico sem interferir com a sensibilidade térmica. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU do CHIKV via intraplantar (i.pl.) ou intra-articular (i.a.) e análises de hipernociceção foram realizadas. A hipernociceção mecânica foi avaliada através dos filamentos de Von Frey (A) e Von Frey eletrônico (B), enquanto a hipernociceção térmica foi avaliada pelo teste de Hargreaves (C). Os camundongos não infectados (Mock) receberam injeção intraplantar de sobrenadante de cultura (C6/36) e foram igualmente avaliados. Os resultados são apresentados como a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal, seguida pela retirada da pata. Os grupos foram de 5 animais. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais infectados via i.pl. e animais NI, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais infectados via i.a. e animais Mock, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way seguido pelo pós teste Newman-Keuls.

Nossos resultados demonstraram que as duas vias de infecção (i.pl. ou i.a.) pelo CHIKV induzem hipernociceção mecânica a partir do 1º dia (Figura 10A-B). De acordo com a análise realizada pelos filamentos de Von Frey, a hipernociceção induzida pela infecção i.pl. se estendeu até o 16º dia, retornando aos níveis basais no 20º dia, enquanto para a infecção i.a. essa manifestação clínica perdurou até o 13º dia e retornou aos níveis basais no 15º dia (Figura 10A). A análise realizada pelo Von Frey eletrônico, por sua vez, demonstrou que não houve diferença entre as duas vias de infecção pelo CHIKV na hipernociceção mecânica, sendo que em ambos os grupos, a hipernociceção teve início no primeiro dia p.i. e os valores retornaram ao estado basal no 21º. dia (Figura 10B). Com relação à hipernociceção térmica, nossos resultados demonstraram que apenas a via i.pl. foi capaz de induzi-la e isso ocorreu apenas na fase aguda da infecção, especificamente nos dias 1 e 3 após a inoculação do CHIKV (Figura 10C). Os animais não infectados demonstraram medidas similares aos valores basais durante todo o período avaliado.

5.2. O tratamento farmacológico dos camundongos infectados pelo CHIKV com diferentes analgésicos foi eficaz no controle da hipernocicepção.

Para avaliar a eficácia de tratamentos analgésicos na hipernocicepção dos animais infectados pelo CHIKV, utilizamos medicamentos de diferentes classes terapêuticas com potencial de controle da dor, a saber: morfina (5mg/kg, i.p. 1 vez ao dia), pregabalina (30mg/kg, i.p. 1 vez ao dia), dexametasona (2mg/kg, i.p. 1 vez ao dia), naproxeno (60mg/kg, i.p. 1 vez ao dia) e celecoxibe (15mg/kg, i.p. 1 vez ao dia). Para todos os medicamentos, utilizamos dois esquemas de tratamento diferentes, conforme representado na figura 11. Vale salientar que as escolhas dos esquemas de tratamento foram baseadas na inflamação induzida pela infecção, ou seja, escolhemos um tempo inicial (D0-2), que representa o início de uma resposta inflamatória aguda robusta, e um tempo mais tardio (D7-9), a partir do qual observamos uma melhora dos parâmetros inflamatórios avaliados. Para o tratamento inicial (D0-2), os camundongos foram tratados nos dias 0, 1 e 2 da infecção, enquanto para o tratamento tardio (D7-9), os camundongos foram tratados nos dias 7, 8 e 9 após a infecção. A hipernocicepção foi avaliada a partir do 1º até o 28º dia da infecção.

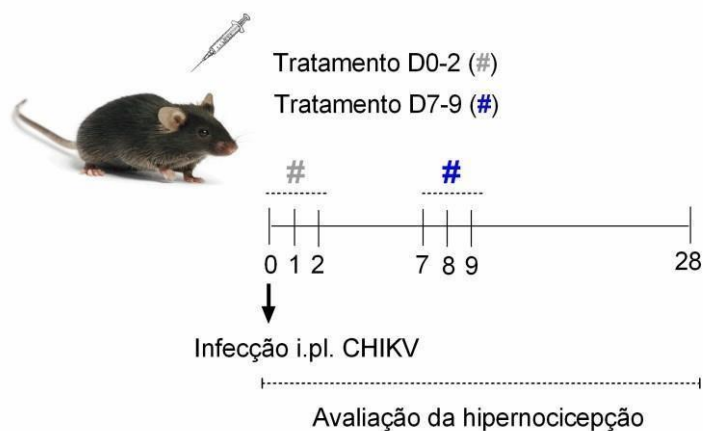


Figura 11: Representação dos esquemas de tratamento farmacológico nos animais infectados pelo CHIKV. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU de CHIKV via intraplantar (i.pl.) e tratados com diferentes medicamentos com efeito analgésico seguindo dois esquemas terapêuticos. No primeiro tratamento (D0-2), os camundongos foram tratados diariamente a partir do dia 0 até o dia 3 após a infecção. No segundo tratamento (D7-9), os camundongos foram tratados diariamente a partir do 7º até o 9º dia após a infecção. A hipernocicepção mecânica foi avaliada durante 28 dias usando o Von Frey eletrônico. # representa o tratamento D0-2 e # representa o tratamento D7-9.

5.2.1. A administração de morfina ou pregabalina em animais infectados pelo CHIKV revertem a hipernocicepção apenas durante o período de tratamento.

Para avaliar o efeito de fármacos que atuam modificando a reação, transdução e transmissão do sinal nociceptivo, os camundongos infectados pelo CHIKV foram tratados com morfina (5mg/kg, i.p. 1 vez ao dia), que é um importante opióide, ou pregabalina (30mg/kg, i.p.1

vez ao dia), que é um importante anticonvulsivante com potencial analgésico. Ambos os medicamentos agem na regulação da transmissão de mensagens excitatórias entre as células nervosas.

Nossos resultados demonstraram que ambos os esquemas de tratamentos para os dois medicamentos foram eficazes para o controle da hipernocicepção induzida pela infecção pelo CHIKV (Figura 12). Como representado na figura 12A, a administração de morfina nos tempos iniciais (D0-2) e mais tardios (D7-9) reverteu completamente o fenótipo de hipernocicepção dos animais durante os dias de tratamento. Contudo, a interrupção do tratamento no 3º dia (D0-2) e no 10º dia (D7-9) resultou no retorno da hipernocicepção nesses animais. De forma interessante, como representado na figura 12B, a administração de pregabalina culminou em um resultado semelhante, ou seja, sua administração nos tempos iniciais (D0-2) e mais tardios (D7-9) reverteu completamente o fenótipo de hipernocicepção dos animais durante os dias de tratamento e a interrupção dos tratamentos resultou em um retorno da hipernocicepção desses animais. Os animais não infectados demonstraram medidas similares aos valores basais durante todo o período avaliado.

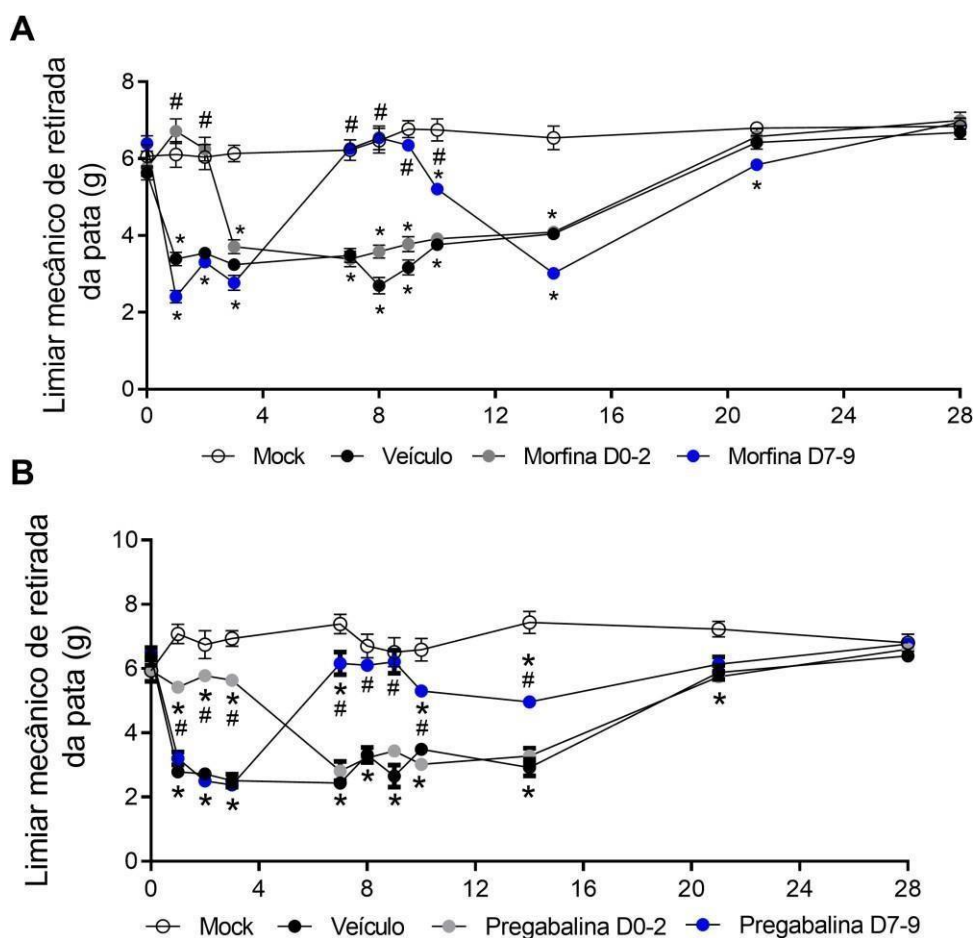


Figura 12: A administração de morfina ou pregabalina em animais infectados pelo CHIKV reverte a hipernociceção apenas durante o período de tratamento. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU de CHIKV via intraplantar (i.pl.) e tratados com (A) morfina (5mg/kg, i.p. 1 vez ao dia) ou (B) pregabalina (30mg/kg, i.p. 1 vez ao dia) em dois esquemas terapêuticos. No primeiro tratamento (D0-2), os camundongos foram tratados diariamente a partir do dia 0 até o dia 3 após a infecção. No segundo tratamento (D7-9), os camundongos foram tratados diariamente a partir do 7º até o 9º dia após a infecção. A hipernociceção mecânica foi avaliada durante 28 dias usando o Von Frey eletrônico. Os camundongos não infectados (Mock) receberam injeção intraplantar de sobrenadante de C6/36, os camundongos não tratados (Veículo) receberam apenas a injeção i.pl. do CHIKV e ambos foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais infectados e animais Mock, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais tratados e animais veículo, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way seguido pelo pós teste Newman-Keuls.

5.2.2. O tratamento de animais infectados pelo CHIKV com anti-inflamatórios foi eficaz para o controle da hipernocicepção aguda

Sabe-se que a dor de origem inflamatória resulta basicamente da interação entre o tecido lesionado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. Para avaliar o papel da resposta inflamatória na hipernocicepção induzida pelo CHIKV, utilizamos como tratamento os medicamentos dexametasona, naproxeno e celecoxibe, os quais possuem em comum uma ação anti-inflamatória bem descrita.

Como representado na figura 13A, a administração de dexametasona, um corticosteroide com ampla ação anti-inflamatória, foi eficaz apenas durante o tratamento em tempos iniciais (D0-2). Neste, a hipernocicepção dos animais foi completamente revertida, mas a interrupção do tratamento no 3º dia após a infecção resultou no retorno da hipernocicepção. Ainda, nossos resultados demonstraram que o tratamento tardio (D7-9) com a dexametasona foi ineficaz, uma vez que os animais apresentaram uma resposta nociceptiva igual à dos animais não tratados (veículo).

Os efeitos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) resultam na redução da síntese de prostaglandinas, e isso ocorre principalmente devido à inibição das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e 2). Aqui, nós utilizamos um inibidor não seletivo da COX, o naproxeno, e um inibidor seletivo da COX-2, o celecoxibe. Nossos resultados demonstraram que, assim como a dexametasona, ambos os medicamentos foram eficazes quando administrados durante o tratamento inicial (D0-2) e reverteram a hipernocicepção dos animais infectados pelo CHIKV (Figura 13B-C). De forma interessante, apesar do tratamento tardio (D7-9) com naproxeno ter sido ineficaz (Figura 13B), o tratamento tardio com celecoxibe reverteu parcialmente a hipernocicepção nos animais infectados (Figura 13C).

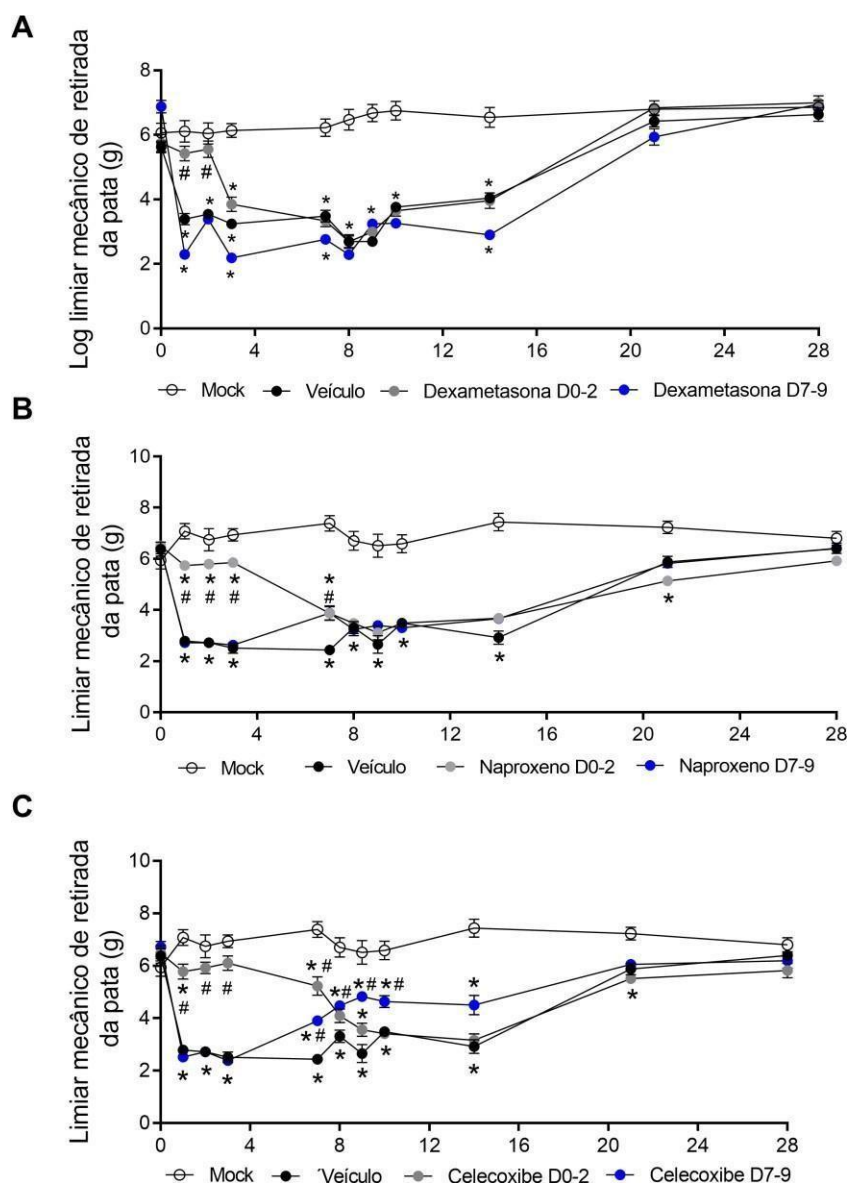


Figura 13: O tratamento via intraplantar de animais infectados pelo CHIKV com dexametasona, naproxeno ou celecoxibe foi eficaz para o controle da hipernocicepção aguda. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU do CHIKV via intraplantar (i.pl.) e tratados com (A) dexametasona (2mg/kg, i.p. 1 vez ao dia), (B) naproxeno (60mg/kg, i.p. 1 vez ao dia) e celecoxibe (15mg/kg, i.p. 1 vez ao dia) em dois esquemas terapêuticos. No primeiro tratamento (D0-2), os camundongos foram tratados diariamente a partir do dia 0 até o dia 3 após a infecção. No segundo tratamento (D7-9), os camundongos foram tratados diariamente a partir do 7º até o 9º dia após a infecção. A hipernocicepção mecânica foi avaliada durante 28 dias usando o Von Frey eletrônico. Os camundongos não infectados (Mock) receberam injeção intraplantar de sobrenadante de C6/36, os camundongos não tratados (Veículo) receberam apenas a injeção i.pl. do CHIKV e ambos foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais infectados e animais Mock, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais tratados e animais veículo, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way seguido pelo teste Newman-Keuls.

Como nossos resultados sugerem que a inibição seletiva de COX-2 através de um tratamento sistêmico apresenta um papel importante no controle da hipernocicepção em nosso modelo, realizamos um tratamento intratecal (local) com celecoxibe nos animais infectados pelo CHIKV. Como representado pela figura 14A, os animais foram infectados e tratados com celecoxibe no dia 0. A hipernocicepção dos animais foi avaliada até o 7º dia após a infecção. Nossos resultados demonstraram que o tratamento foi eficaz apenas no 1º dia após a infecção, no qual houve reversão completa da hipernocicepção dos animais. A partir do 3º dia após a infecção, o tratamento não foi capaz de reverter o fenótipo de hipernocicepção induzido pela infecção (Figura 14B).

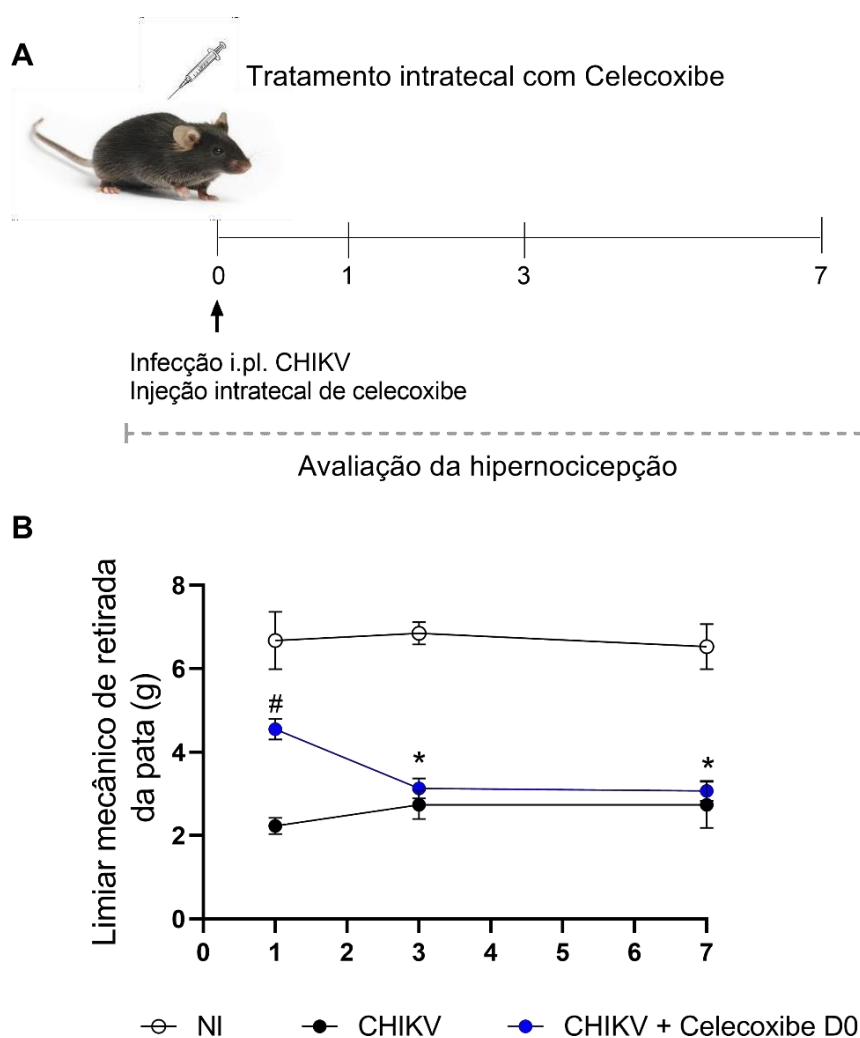


Figura 14: O tratamento intratecal com celecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2, melhora a hipernocicepção aguda induzida pela infecção pelo CHIKV. (A) Esquema experimental. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU de CHIKV via intraplantar (i.pl.) e análises de hipernocicepção foram realizadas. Os camundongos foram tratados com celecoxibe por via intratecal (5ug) (B) em momentos específicos de infecção. Os camundongos não infectados (Mock) receberam injeção intraplantar de sobrenadante de C6/36 e foram igualmente avaliados. Os resultados são apresentados como a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal, seguida pela retirada da pata. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos controle não infectados (Mock) e # quando comparado aos camundongos tratados, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way seguido pelo pós teste Newman-Keuls.

5.3. A infecção pelo CHIKV induz aumento na expressão de CXCL-1, TNF, CCR5 e COX-2 no gânglio da raiz dorsal (DRG) de camundongos.

Os níveis de TNF, CXCL-1, CCR5 e COX-2 foram quantificados nos DRGs correspondentes ao membro inferior direito dos camundongos (segmentos de L3-5) durante o curso da infecção, uma vez que esse tecido corresponde ao centro metabólico de cada célula neuronal associada às fibras sensoriais que respondem aos diferentes estímulos nocivos.

A figura 16A demonstra que os níveis no DRG de TNF estão aumentados, em relação aos animais não infectados, no 7º e 14º dia após a infecção, retornando aos níveis basais no 21º dia. Já os níveis de CXCL1, CCR5 e COX-2 encontram-se aumentados apenas no 1º dia de infecção (Figura 15B-D), retornando aos níveis basais no 3º dia.

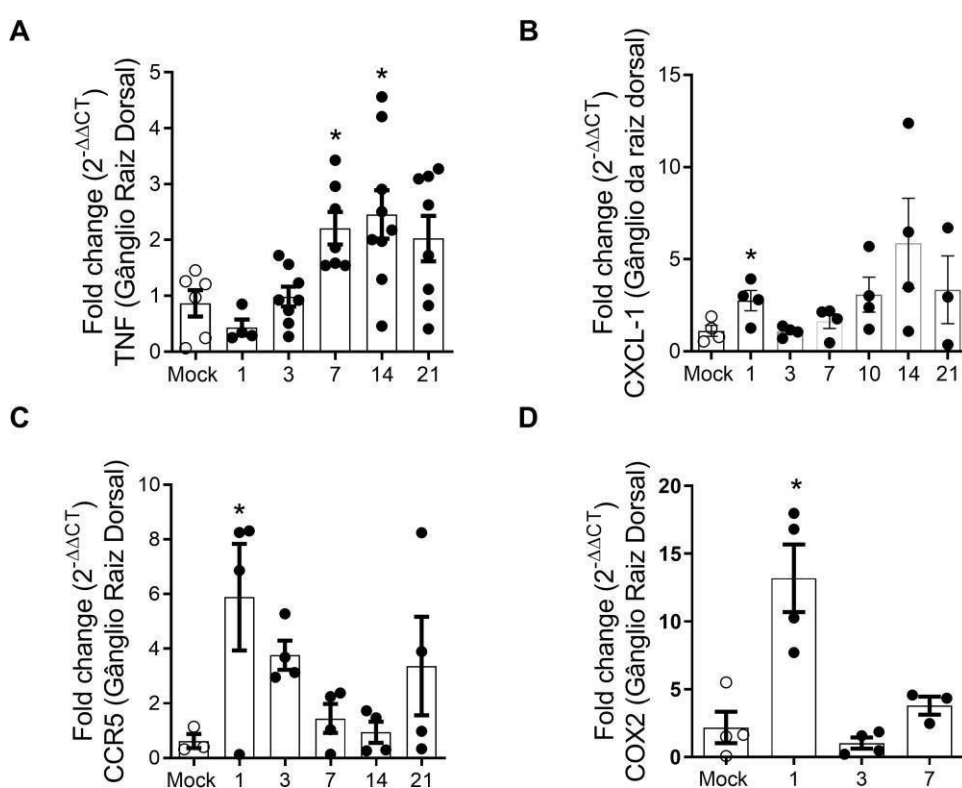


Figura 15: A infecção pelo CHIKV induz aumento na expressão de TNF, CXCL-1, CCR5 e COX-2 no DRG de camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6 com 4 semanas de idade foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU do CHIKV via intraplantar (i.pl) e os níveis de (A) TNF, (B) CXCL1, (C) CCR5 e (D) COX-2 no DRG foram analisados por qRT-PCR durante a cinética da infecção (1, 3, 7 e 14 dias). Os resultados foram expressos como Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os camundongos não infectados (Mock) receberam injeção intraplantar de sobrenadante de C6/36 e foram igualmente avaliados. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparado com camundongos controle não infectados (Mock), conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA one-way seguido pelo pós teste Newman-Keuls.

5.4. A ausência de receptor de TNF está associada a uma melhora nos parâmetros clínicos e inflamatórios da infecção pelo CHIKV.

É descrito que o TNF desempenha um papel importante em várias doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, e em infecções virais. Além disso, sabe-se que o TNF é denominado citocina pró-algésica porque atua diretamente nos nociceptores para sensibilizar as vias da dor. Demonstramos, em nosso modelo experimental, um aumento acentuado dessa citocina na pata de camundongos imunocompetentes infectados pelo CHIKV. Ainda, vimos que essa citocina está aumentada no DRG dos animais no 7º e 14º dia da infecção (Figura 15A). Dessa forma, decidimos avaliar o seu papel em nosso modelo experimental utilizando camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes para o receptor TNF (TNFRp55^{-/-}).

Primeiramente, avaliamos a hipernocicepção de camundongos imunocompetentes (WT) e TNFRp55^{-/-} infectados pelo CHIKV e observamos que enquanto os camundongos WT apresentavam hipernocicepção elevada do 1º ao 14º dia após a inoculação do vírus, a intensidade e a duração da hipernocicepção foram significativamente reduzidas nos camundongos deficientes para o receptor dessa citocina. Os níveis nociceptivos dos camundongos TNFRp55^{-/-} retornaram aos valores basais no 14º dia após a infecção. Os animais não infectados demonstraram medidas similares aos valores basais durante todo o período avaliado (Figura 16A). De acordo com a figura 16B, ambos os grupos, WT e TNFRp55^{-/-} apresentaram um aumento semelhante do edema plantar nos dias 1 e 3 após a infecção pelo CHIKV, retornando aos níveis basais no 7º dia. No entanto, a recuperação da carga viral viável foi maior em camundongos TNFRp55^{-/-}, como demonstrado no 1º dia (linfonodo poplíteo, joelho, baço e plasma) e no 7º dia (pata e articulação) em comparação ao grupo WT (Figura 16C).

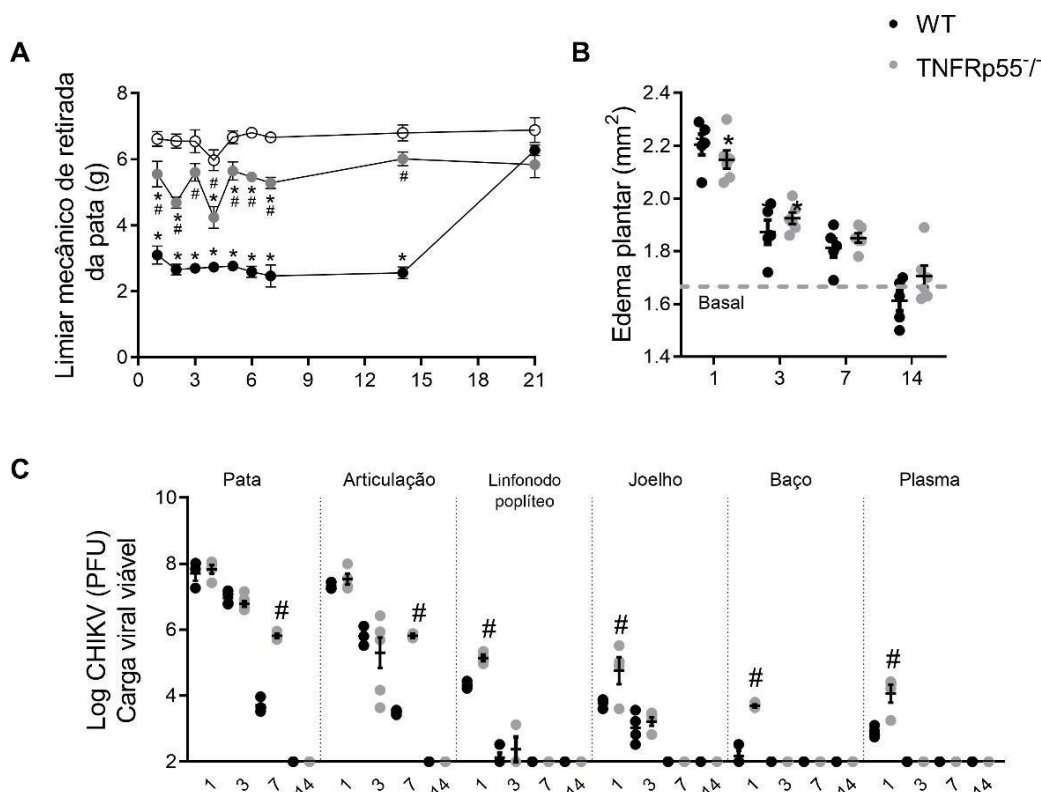


Figura 16: A ausência de receptor de TNF atenua o fenótipo de hipernociceção dos animais infectados pelo CHIKV e retarda o clearance viral. Os camundongos da linhagem C57BL/6 ou camundongos nocaute do receptor de TNF (TNFRp55^{-/-}) foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU de CHIKV via intraplantar (i.pl.) e foram submetidos à análises de hipernociceção, edema plantar e quantificação da carga viral. A hipernociceção mecânica foi avaliada através dos filamentos de Von Frey (A). Os resultados são apresentados como as diferenças entre a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal, seguida pela retirada da pata, antes e após a inoculação do CHIKV. B) O edema plantar induzido pelo CHIKV foi avaliado medindo a altura e a largura da área perimetatarsal do pé traseiro. Os resultados são mostrados em mm². C) Análise de ensaio de placa de pata, articulação, linfonodo poplíteo, joelho, músculo quadríceps, baço e plasma. Os resultados são mostrados como log de PFU por g de tecido ou PFU por mL de plasma. Os camundongos não infectados (NI) receberam injeção intraplantar de sobrenadante de cultura C6/36 e foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais infectados via i.pl. e animais NI, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais C57BL/6 e TNFRp55^{-/-} infectado, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way (A e C) ou one-way (B) seguido pelo pós teste Newman-Keuls.

Quando analisamos o influxo de neutrófilos, avaliado pela atividade da MPO, ambos os grupos apresentaram aumento do 1º ao 7º dia após a infecção, sem diferença entre eles (Figura 17A). No entanto, houve uma diferença importante na produção de mediadores inflamatórios entre os grupos infectados pelo CHIKV de camundongos WT e TNFRp55^{-/-} (Figura 17B-E). A infecção de camundongos C57BL/6 induziu a produção aguda de mediadores pró-inflamatórios (Figura 17B-D). Os camundongos TNFRp55^{-/-} mostraram uma redução em todas os mediadores com atividade pró-inflamatória avaliados, mas, em contrapartida, mostraram um aumento na produção de IL-10, uma citocina com atividade anti-inflamatória. Mais especificamente, os níveis de IL-6 aumentaram no primeiro dia após a infecção por CHIKV em ambos os grupos, mas os camundongos TNFRp55^{-/-} apresentaram níveis mais baixos do que os camundongos WT infectados com CHIKV (Figura 17B). Por outro lado, os níveis de IL-10 aumentaram apenas nos camundongos TNFRp55^{-/-} no 1º e 7º dias após a infecção, permanecendo inalterados nos camundongos WT (Figura 17E). Em relação às quimiocinas analisadas, observamos que ambos os grupos, camundongos WT e TNFRp55^{-/-} infectados, apresentaram aumento nos níveis de CCL2 e CXCL-9 do dia 1 ao dia 7 após a infecção. No entanto, camundongos TNFRp55^{-/-} apresentaram níveis mais baixos das mesmas quimiocinas quando comparados aos camundongos WT, em todos os momentos analisados (Figura 17C-D).

As alterações histopatológicas das patas dos camundongos demonstraram que ambos os grupos tiveram um infiltrado celular aumentado nos dias 1 e 3 após a infecção pelo CHIKV e não houve diferença entre os grupos nos tempos iniciais avaliados. Em contraste, os animais TNFRp55^{-/-} mostraram uma redução significativa no infiltrado celular e dano tecidual no 7º dia em comparação com o grupo WT. Todos os grupos retornaram aos níveis basais no 14º dia (Figura 17F). Dessa forma, nossos resultados mostraram que a ausência do receptor 1 de TNF está relacionada à uma redução da hipernocicepção induzida pela infecção pelo CHIKV, bem como à indução de uma resposta inflamatória local reduzida.

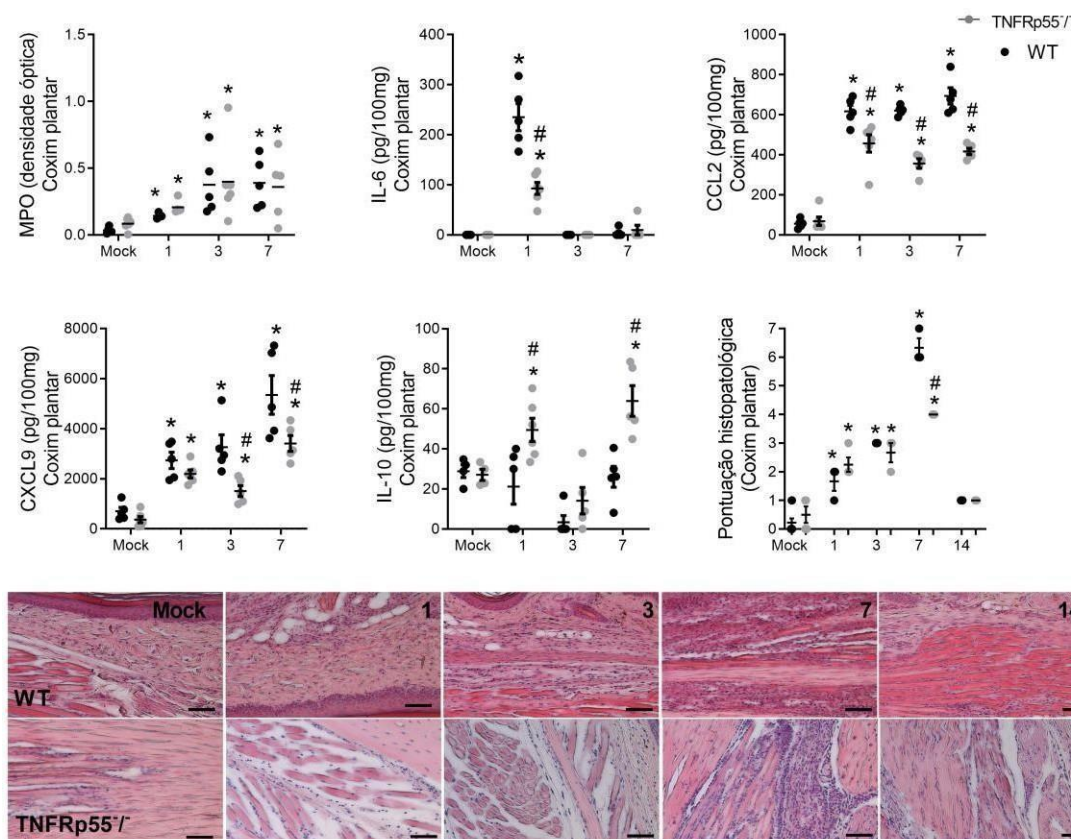


Figura 17: A ausência de receptor de TNF melhora os parâmetros inflamatórios associados à infecção pelo CHIKV. Os camundongos da linhagem C57BL/6 ou camundongos nocaute do receptor de TNF TNFRp55^{-/-} foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU de CHIKV via intraplantar (i.pl.) e diversas análises inflamatórias foram realizadas. A) O influxo de neutrófilos para a pata foi medido indiretamente pela avaliação da atividade de MPO. Os níveis de B) IL-6, C) CCL2, D) CXCL9 e E) IL-10 na pata foram analisados por ELISA em diferentes momentos. Os resultados são expressos como pg/100mg do coxim plantar. F) Mostra análise semiquantitativa (pontuação histopatológica) após coloração com Hematoxilina e Eosina da pata de camundongos não infectados e infectados com CHIKV, 1, 3, 7 e 14 dias após a infecção. Imagens representativas dos cortes da pata. Ampliação original: 200x. Barra de escala: 100 μ M. Os camundongos não infectados (Mock) receberam injeção intraplantar de sobrenadante de C6/36 e foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais infectados via i.pl e animais Mock, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais C57BL/6 e TNFRp55^{-/-} infectados, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA one-way seguido pelo pós teste Newman-Keuls.

Para confirmar o papel de TNF na patogênese da doença induzida pelo CHIKV, decidimos empregar a estratégia de inibição farmacológica do TNF com o etanercepte, um fármaco eficaz, seguro e amplamente utilizado para o tratamento da artrite. O etanercepte é uma proteína de fusão formada pela porção extracelular do receptor TNF tipo II e a porção Fc da imunoglobulina G1 humana com meia vida longa. Essa droga foi o primeiro agente biológico aprovado para o tratamento da artrite reumatóide e seu mecanismo de ação é a ligação ao TNF endógeno antes de se ligar ao seu receptor de superfície celular (TNFR). Considerando que o parâmetro de doença mais importante dos pacientes infectados pelo CHIKV é a artralgia, avaliamos se o tratamento com etanercepte, sistêmico ou local, é eficaz no controle da hipernocicepção. Conforme mostrado na figura 18A, realizamos um tratamento intraperitoneal ou intratecal em camundongos infectados pelo CHIKV, com base na produção de TNF na pata e no gânglio da raiz dorsal em nosso modelo. O protocolo de tratamento está descrito em detalhes na figura 18A. Conforme mostrado na figura 18A-B, escolhemos os dias 0, 3 ou 7 da infecção para iniciar o tratamento sistêmico com o etanercepte, devido aos níveis de TNF no coxim plantar estarem elevados do dia 1 ao dia 7 após a infecção. De forma interessante, os camundongos tratados com etanercepte a partir do dia 0 da infecção mostraram uma redução significativa na intensidade e duração da hipernocicepção em comparação com o grupo não tratado (CHIKV), assim como foi observado nos camundongos TNFRp55^{-/-} (Figura 18A). Outro grupo de camundongos tratados a partir do 3º dia de infecção mostrou uma redução na intensidade da hipernocicepção 1 dia após o tratamento com etanercepte (4º dia de infecção) e retornou aos níveis basais no 14º dia de infecção, em contraste com camundongos não tratados que retornaram apenas no 21º dia. Por outro lado, camundongos tratados sistemicamente após o 7º dia de infecção não mostraram diferença no limiar de nocicepção em comparação com animais não tratados (Figura 18B).

Com relação ao tratamento intratecal, optamos por dois esquemas terapêuticos, 0 (1 hora após a infecção) ou 12 dias após a infecção, pois observamos aumento do TNF no gânglio da raiz dorsal no 7º e 14º dias após a infecção (Figura 15A). Conforme observado na figura 18C, os camundongos tratados por via intratecal a partir do dia 0 não apresentaram diferença no limiar de nocicepção em comparação com os animais não tratados. Por outro lado, os camundongos tratados por via intratecal a partir do 12º dia mostraram uma redução significativa na hipernocicepção em comparação com os animais não tratados no 14º dia (Figura 18C).

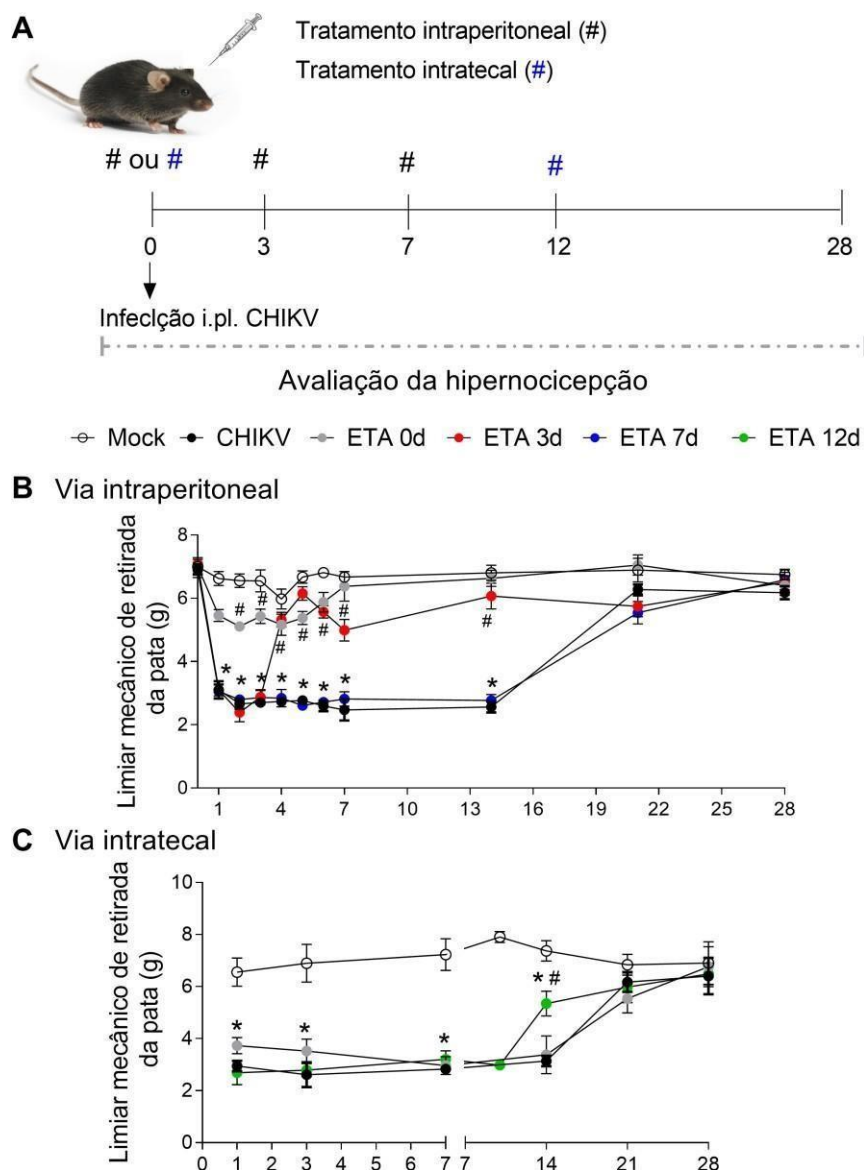


Figura 18: O tratamento com etanercepte (ETA), um inibidor de TNF, melhora a hipernocicepção induzida pela infecção pelo CHIKV. (A) Esquema experimental. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com $1,0 \times 10^6$ PFU de CHIKV via intraplantar (i.pl.) e análises de hipernocicepção foram realizadas. Os camundongos foram tratados com etanercepte (ETA) por via intraperitoneal (25mg / kg) (B) ou intratecal (5ug) (C) em momentos específicos de infecção. Os camundongos não infectados (Mock) receberam injeção intraplantar de sobrenadante de C6/36 e foram igualmente avaliados. Os resultados são apresentados como a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal, seguida pela retirada da pata. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos controle não infectados (Mock) e # quando comparado aos camundongos tratados, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way seguido pelo pós teste Newman-Keuls.

6. DISCUSSÃO

Embora a CHIKF tenha sido relatada pela primeira vez há mais de meio século, muitos aspectos acerca de sua patogênese não foram elucidados. Durante a última década, o CHIKV se disseminou pelo mundo de forma acentuada e, conseqüentemente, tem recebido grande atenção por parte das autoridades de saúde pública. Apesar de apresentar uma taxa de mortalidade baixa, os sintomas e a natureza crônica dessa doença são preocupantes, uma vez que resultam em queda massiva da qualidade de vida dos indivíduos acometidos e grande impacto econômico aos órgãos públicos de saúde (GANESAN *et al.*, 2017). Somado a isso, a ineficácia das medidas preventivas contra o mosquito vetor, a ausência de terapia específica, bem como a ausência de uma vacina, desencadeou, nos últimos tempos, um cenário preocupante em escala mundial (BURT *et al.*, 2017).

Atualmente, existem poucos modelos *in vivo* de infecção pelo CHIKV que mimetizam os vários parâmetros da doença observados durante a infecção aguda e crônica. Em geral, esses modelos apresentam uma grande desvantagem, pois utilizam camundongos sem o sistema imunológico intacto (COUDERC *et al.*, 2008; HAWMAN *et al.*, 2013; POO *et al.*, 2014; SEYMOUR *et al.*, 2015). Durante o meu mestrado, padronizamos um modelo murino de infecção pelo CHIKV que mimetiza grande parte das manifestações associadas à doença. Nós demonstramos que a infecção intraplantar pelo CHIKV em camundongos jovens (4 semanas de idade) induz hipernocicepção mecânica a partir do 1º dia até o 20º dia de infecção e isto foi associado à uma intensa resposta inflamatória local a partir do 1º dia, representada por um maior recrutamento de neutrófilos para os sítios de infecção, aumento na produção de diversos mediadores inflamatórios, citocinas (TNF e IL-6) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2 e CXCL9), e recuperação de carga viral no coxim plantar, tornozelo, linfonodo poplíteo e quadríceps dos animais. Além disso, observamos alterações histopatológicas nas articulações do tornozelo e joelho, também a partir do 1º dia, mesmo sem haver perda óssea ou alterações na função motora dos animais. Contudo, apesar da hipernocicepção perdurar por até 20 dias, as alterações inflamatórias não foram mais observadas em nosso modelo a partir do 14º dia de infecção. Nesse contexto, acreditamos que a hipernocicepção induzida pelo CHIKV pode apresentar componentes inflamatórios e não inflamatórios para a sua manutenção. Dessa forma, o nosso objetivo neste trabalho consistiu em explorar os mecanismos e mediadores associados à hipernocicepção induzida pelo CHIKV.

Um parâmetro clínico importante e característico da febre chikungunya, mas até então não abordado em outros modelos experimentais, é a dor, ou hipernocicepção em animais experimentais. A dor é uma característica comum associada às artrites de diversas origens: artrite reumatóide, gota e a artrite infecciosa, por exemplo, causada por bactérias (artrite séptica) (COSTA *et al.*, 2012; SACHS *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2016; BOFF *et al.*, 2018; GALVÃO *et al.*, 2017). De maneira semelhante, diversos trabalhos têm associado dores articulares persistentes e muitas vezes incapacitantes com a febre chikungunya em humanos (SISSOKO *et al.*, 2009; MANIMUNDA *et al.*, 2010; DUPUIS-MAGUIRAGA *et al.*, 2012; HEATH *et al.*, 2018). Primeiramente, decidimos caracterizar melhor a hipernocicepção induzida pela infecção pelo CHIKV. Neste trabalho, nós demonstramos que camundongos imunocompetentes jovens (4 semanas de idade) da linhagem C57BL/6j, infectados via intraplantar pelo CHIKV, desenvolveram hipernocicepção mecânica prolongada (por até 20 dias) e apresentaram uma diminuição do limiar de resposta frente a estímulos nociceptivos térmicos na fase aguda da infecção (1º e 3º dia), o que caracteriza alteração sensorial nestes animais. Os camundongos infectados via intra-articular, por sua vez, apesar de também desenvolverem hipernocicepção mecânica prolongada, não responderam aos estímulos nociceptivos térmicos em nenhum tempo analisado. De forma interessante, recentemente foi demonstrado que a infecção intraplantar pelo vírus mayaro, um alfavírus emergente de importância médica, também induz hipernocicepção mecânica (SANTOS *et al.*, 2019; MOTA & COSTA *et al.*, 2019). Além disso, o nosso grupo já demonstrou que a infecção pelo vírus da dengue foi capaz de induzir hipernocicepção mecânica em camundongos adultos (SOUZA *et al.*, 2009). Ainda, trabalhos anteriores mostram a presença de hiperalgesia térmica e mecânica em camundongos artríticos (COSTA *et al.*, 2015; NEELAKANDAN & VENKATESAN, 2016; BOFF *et al.*, 2018; CHAGAS *et al.*, 2017). Com base nesses resultados, optamos por utilizar a via de infecção intraplantar para a realização dos próximos experimentos.

Até o momento, não há tratamento antiviral específico para a CHIKF e a terapia utilizada é de suporte sintomático. O manejo farmacológico dos pacientes com CHIKF é realizado de acordo com a fase da doença e a classificação da dor. De forma geral, medicamentos de diferentes classes terapêuticas com potencial analgésico são utilizados nestes pacientes, como anti-inflamatórios não esteroides, corticosteroides, opioides, antidepressivos tricíclicos entre outros (Ministério da Saúde, 2017). Com o objetivo de entender os componentes inflamatórios e não inflamatórios associados à hipernocicepção observada em nosso modelo, separamos didaticamente este parâmetro em duas fases de acordo com a resposta inflamatória induzida pela infecção: fase aguda (1 a 7 dias – presença de inflamação) e de manutenção (a partir de 7 dias – início da resolução da inflamação). Em seguida, avaliamos a eficácia de tratamentos farmacológicos na hipernocicepção dos animais nas duas fases descritas. Nossos resultados demonstraram que os tratamentos nas duas fases com a morfina (5mg/kg, i.p. 1 vez ao dia)

reverteram completamente o fenótipo de hipernocicepção dos animais infectados. Os compostos opioides, como a morfina, são amplamente conhecidos por produzirem uma analgesia potente que é eficaz no tratamento de vários tipos de dor (CHRISTRUP, 1997). Os receptores opioides neuronais estão amplamente distribuídos por todo o sistema nervoso periférico (gânglios da raiz dorsal e trigêmeo) e central (medula espinhal e cérebro) (MACHELSKA & CELIK, 2020). Todos os quatro receptores opioides medeiam analgesia em modelos animais (MACHELSKA & CELIK, 2020). No entanto, a maioria dos opióides usados clinicamente para o tratamento da dor são agonistas do receptor μ , como a morfina. Mecanicamente, a ação de opióides resulta na supressão de vários canais iônicos envolvidos na facilitação da dor, como TRPV1, HCN, ASIC e Nav dependentes de voltagem (GUTSTEIN & AKIL, 2005; STEIN *et al.*, 1991; MACHELSKA & CELIK, 2020). Nossos resultados vão de encontro com a literatura, uma vez que, em muitos modelos animais de dor, a administração de morfina causa redução da hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos (BIAN *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1995; CHU *et al.*, 2000, TSAI *et al.*, 2000; DESEURE *et al.*, 2002; DESEURE *et al.*, 2004). De forma semelhante, nós demonstramos que os tratamentos nas duas fases com a pregabalina (30mg/kg, i.p. 1 vez ao dia) também reverteu completamente o fenótipo de hipernocicepção dos animais infectados pelo CHIKV. A pregabalina, fármaco anticonvulsivante com importante ação analgésica, é clinicamente a primeira linha de tratamento para a dor neuropática (PORTA *et al.*, 2016). Sua ação pode alterar as correntes de cálcio celular, ajustar a liberação de neurotransmissores e alterar a excitabilidade neuronal combinando canais de cálcio dependentes de voltagem, o que culmina na regulação da transmissão de mensagens excitatórias entre as células nervosas (DOOLEY *et al.*, 2002). Diversos trabalhos demonstraram que a pregabalina é eficaz para o tratamento da dor neuropática associada à neuralgia pós-herpética, neuropatia periférica diabética e fibromialgia (DWORKIN *et al.*, 2003; GORE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2017). Em modelos animais de dor neuropática, o tratamento com pregabalina foi altamente eficaz no alívio da alodinia e hiperalgesia, o que reforça nossos achados (WANG *et al.*, 2015; VERMA *et al.*, 2014). Vale ressaltar que o tratamento com esses dois fármacos, morfina ou pregabalina, foi eficaz apenas durante o tratamento, ou seja, a interrupção das administrações dos medicamentos resultou em um retorno da resposta nociceptiva igual à do grupo não tratado. De forma interessante, esse achado está associado ao tempo de meia vida de ambos os fármacos, que são curtos, aproximadamente 3 horas para morfina e 6 horas para pregabalina, o que significa um tempo de duração da ação também curto (CHRISTRUP, 1997; DOOLEY *et al.*, 2002). Dessa forma, nossos dados sugerem que os efeitos dos tratamentos com morfina ou pregabalina são decorrentes de uma ação direta da sensibilização dos nociceptores e não alteram a causa do processo.

Com relação aos tratamentos com anti-inflamatórios, nós demonstramos que o uso de dexametasona (2mg/kg, i.p. 1 vez ao dia) foi eficaz na fase aguda, uma vez que reverteu

completamente o fenótipo de hipernocicepção dos animais, mas não na fase de manutenção. A dexametasona é um corticosteroide que inibe de forma completa a reação inflamatória através de seus efeitos inibitórios sobre a liberação mediadores inflamatórios, prostanóides e fator de ativação plaquetária, modulação de sistemas enzimáticos envolvidos na inflamação e efeito sinérgico sobre moléculas endógenas, como as catecolaminas (DI ROSA *et al.*; 1985). Diversos trabalhos demonstraram que injeções intraperitoneais ou intra-articulares de dexametasona reduzem significativamente a gravidade da artrite de diferentes origens (YANG *et al.*, 1997; GRODZINSKY *et al.*, 2017; DELGADO-NOGUERA *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2019; LORSCHIEDER *et al.*, 2019). Ainda, a eficácia da ação antinociceptiva desse fármaco é bem demonstrada na literatura, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (TAKASAKI *et al.*, 2005; DÜRSTELER *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2018). Nosso dado corrobora a hipótese de que a resposta inflamatória local induzida pelo CHIKV na fase inicial da infecção é importante para a gênese da hipernocicepção, uma vez que o término do tratamento inicial com esse potente corticosteroide culminou no retorno da hipernocicepção nos animais. De forma semelhante, também demonstramos que os tratamentos iniciais com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) inibidores da ciclooxigenase foram eficazes na hipernocicepção induzida pelo CHIKV. Os efeitos anti-inflamatórios e analgésicos desses fármacos são devido principalmente à inibição da enzima COX, a qual catalisa a biossíntese dos prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) a partir da cascata do ácido araquidônico em uma variedade de processos patofisiológicos (PATRONO, *et al.*, 2001; SIMON, 2001). Os prostanóides, principalmente a prostaglandina E2 (PGE2), são os mediadores lipídicos mais conhecidos que contribuem para a dor inflamatória (KAWABATA, 2011). Nesse contexto, os AINEs são os analgésicos mais amplamente utilizados por suprimirem a dor inflamatória em pacientes com artrite reumatóide, osteoartrite, gota e enxaqueca (KAWABATA, 2011). Ainda, diversos trabalhos demonstraram o efeito antinociceptivo dessa classe terapêutica em diferentes modelos animais de dor (MIRANDA *et al.*, 2006; DIONNE *et al.*, 2001; MIRANDA *et al.*, 2019). Neste trabalho, utilizamos um inibidor não seletivo (naproxeno) e seletivo para a COX-2 (celecoxibe) e demonstramos que, apesar de ambos serem eficazes no tratamento inicial (D0-2), apenas o celecoxibe reverteu o fenótipo de hipernocicepção dos animais no tratamento tardio (D7-9). Sabe-se que a COX possui duas isoformas: COX-1, a qual é expressa constitutivamente e é responsável principalmente pelas atividades fisiológicas das prostaglandinas, e COX-2, cuja expressão é induzida principalmente em condições inflamatórias (PATRONO *et al.*, 2001). O celecoxibe, AINE com atividade seletiva na COX-2, é usado para o tratamento da artrite reumatóide e osteoartrite em humanos (CLEMETT & GOA, 2000). Foi demonstrado que o celecoxibe possui outros mecanismos de ação, como alteração da atividade microglial e interação com sistemas opióides, canabinóides e com uma variedade de canais iônicos, especialmente com canais de potássio dependentes de voltagem da família Kv7

(BRUEGGEMANN *et al.*, 2009; REZENDE *et al.*, 2012; FROLOV & SINGH, 2014; VICENTE-BAZ, 2019). Alguns trabalhos demonstraram que o tratamento sistêmico ou intratecal com celecoxibe foi eficaz na redução de comportamentos nociceptivos em vários modelos animais de dor, sugerindo ações periféricas e centrais desse fármaco (INOUE *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2013; NISHIYAMA, 2006; LEE & SEO, 2008). Interessantemente, foi demonstrado que o tratamento oral com esse fármaco atenuou a hiperalgia pós-operatória, bem como a hiperalgia em um modelo de dor neuropática (ligadura parcial do nervo ciático) (OLIVEIRA *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2015). Esses trabalhos corroboram nosso dado, uma vez que a eficiência do celecoxibe na fase tardia da hipernociceção induzida pelo CHIKV pode ser devido a outros mecanismos que não apenas a inibição da resposta inflamatória aguda.

Até aqui, os nossos resultados demonstram que a inflamação local induzida pela infecção, especificamente a ação de citocinas sensibilizantes importantes no processo de analgesia, como TNF, IL-1 β e IL-6, são importantes para a nociceção articular induzida pelo CHIKV. Então, nosso próximo passo foi avaliar o estado inflamatório do gânglio da raiz dorsal (DRG), já que é bem estabelecido na literatura que o DRG possui um importante papel no desenvolvimento e manutenção da dor crônica. De forma geral, após um dano tecidual, podem ocorrer diversas alterações a nível periférico, como o recrutamento de células imunes e consequente liberação prolongada de mediadores inflamatórios que contribuem para a manutenção da dor, mesmo após a resolução da lesão original (ESPOSITO *et al.*, 2019). Interessantemente, nós demonstramos uma maior expressão de CXCL1, CCR5 e COX2 no 1º dia e de TNF no 7º e 14º dia de infecção. Nossos achados são consistentes com o papel dessas moléculas inflamatórias para a sensibilização de neurônios no DRG para o desenvolvimento de hiperalgia (ARALDI *et al.*, 2013; LEISENGANG *et al.*, 2018). A presença de TNF, citocina pró-algésica, em estruturas periféricas e centrais é fundamental para a persistência da dor articular na artrite (FELDMANN *et al.*, 1996). Durante a inflamação das articulações em modelos experimentais de artrite, o TNF regulado positivamente no DRG está associado a um aumento da nociceção articular (SEGOND VON BANCHET *et al.*, 2009). Dessa forma, nosso próximo passo consistiu em avaliar o papel do receptor de TNF na infecção pelo CHIKV. De forma muito interessante, nós demonstramos que a ausência do receptor de TNF, através do uso de animais geneticamente modificados, melhora significativamente a hipernociceção induzida pela infecção pelo CHIKV e isso está associado a uma resposta inflamatória local mais branda, com uma menor produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-6, CCL2 e CXCL9) e aumento da produção de IL-10, que é um importante mediador com atividade anti-inflamatória. Como consequência, os animais deficientes para o receptor de TNF apresentam uma lesão histopatológica significativamente menor no tornozelo e na articulação do joelho. No entanto, o clearance viral dos animais TNFRp55^{-/-} foi significativamente reduzido em todos os órgãos avaliados, o que pode ser devido à uma menor resposta pró-inflamatória nesses animais. Diante

desses achados, nós decidimos avaliar o papel do etanercept, um inibidor de TNF, em nosso modelo. Como resultado, demonstramos que o bloqueio do TNF com etanercepte administrado por via intraperitoneal em tempos iniciais (D0 ou D3), mas não em tempos tardios (D7), foi eficaz na melhora da hipernocicepção dos animais, provavelmente pela inibição do TNF presente na periferia (Figura 12A). De forma contrária, a administração de etanercepte por via intratecal reverteu a hipernocicepção dos animais apenas no tempo tratamento mais tardio (D12), o que parece estar associado à inibição do TNF periférico (Figura 16A). Apesar de um trabalho ter demonstrado que a inibição farmacológica de TNF com etanercepte em camundongos infectados com o alfavírus RRV leva à uma piora da doença (ZAID *et al.*, 2011), nosso achado é corroborado por alguns trabalhos que demonstram que a inibição periférica do TNF é capaz de reduzir a hipernocicepção persistente em um modelo de artrite induzida por antígeno (QUADROS *et al.*, 2015; GONÇALVES, 2019). Em conjunto, nossos dados sugerem que a resposta inflamatória local possui um papel importante no desenvolvimento da hipernocicepção induzida pelo CHIKV e essa resposta parece ser dependente de TNF. Sabe-se que em modelos de inflamação induzida por carragenina ou LPS, há uma produção inicial de TNF pelas células residentes e que esse mediador é crucial para induzir a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , em uma cascata que culmina com a produção de prostaglandinas, as quais sensibilizam diretamente os nociceptores e, conseqüentemente, levam à dor (CUNHA *et al.*, 2005).

Sumarizando, neste trabalho caracterizamos o principal parâmetro da CHIKF, a hipernocicepção prolongada, a qual está associada a uma intensa resposta inflamatória local e dano tecidual. Demonstramos o efeito de diferentes fármacos com atividade analgésica na hipernocicepção e nossos dados sugerem que a gênese da hipernocicepção induzida pelo CHIKV é dependente da inflamação aguda local, mas a sua manutenção parece estar associada a um estado inflamatório no DRG dos animais, mais especificamente a um aumento na expressão de TNF nesse tecido em tempos mais tardios. Ainda neste trabalho, demonstramos que a ausência do receptor de TNF ou a inibição farmacológica desse mediador protegeu os animais dos parâmetros de doença avaliados, o que abre perspectivas para um potencial alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADIE, C., et al. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 13, p. 7947- 52, 2003.
- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. *Antiviral Research*, v. 121, p. 59–68, 2015.
- AMARAL, F. A.; BASTOS, LEANDRO F. S. ; OLIVEIRA, THIAGO H. C. ; DIAS, ANA C. F. ; OLIVEIRA, VÍVIAN L. S. ; TAVARES, LÍVIA D. ; COSTA, V. V.; GALVÃO, I.; SORIANI, F. M.; SZYMKOWSKI, D. E.; RYFFEL, V.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. . Transmembrane TNF- α is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. *European Journal of Immunology*, v. 46, p. 204-211, 2016.
- ANWAR, K. Pathophysiology of pain. *Disease-A-Month: DM*, v.69, n.4, p.375- 383, 2016.
- ARALDI, D.; FERRARI, L. F.; LOTUFO, C. M.; VIEIRA, A. S.; ATHIE, M. C.; FIGUEIREDO, J. G.; DUARTE, D. B.; TAMBELI, C. H.; FERREIRA, S. H.; PARADA, C. A. Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci*, 2013
- ARROYO-AVILA, M.; VILA, L. M. Rheumatic Manifestations in Patients with Chikungunya Infection. *P R Health Sci J.*, v. 34, n. 2, p. 71-77, 2015.
- BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I. M. Pain and immunity: implications for host defence. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, 433-447, 2019.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, p. 267 - 284, 2009.
- BERGER, A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*, v. 321, p. 424, 2000.
- BIAN, D.; NICHOLS, M. L.; OSSIPOV, M. H.; LAI, J.; PORRECA, F. Characterization of the antiallodynic efficacy of morphine in a model of neuropathic pain in rats. *NeuroReport*, 6, 1981-1984, 1995.
- BOFF, D.; CRIJNS, H.; JANSSENS, R.; VANHEULE, V.; MENEZES, G. B.; MACARI, S.; SILVA, T. A.; AMARAL, F. A.; PROOST, P. The chemokine fragment CXCL9(74-103) diminishes neutrophil recruitment and joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 104, p. 413-422, 2018.
- BORGHENINI, G.; POUBEAU, P.; JOSSAUME A.; GOUIX A.; COTTE L.; MICHAULT A.; ARVIN-BEROD C.; PAGANIN F. Persistent arthralgia associated with Chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clin Infect Dis.*, v. 47, n. 4, p. 469-75, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Cuidados paliativos oncológicos: controle da dor. Rio de Janeiro: INCA, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica (SE) 53, 2014. *Boletim Epidemiológico*, v. 46, n. 3, 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at---SE-53.pdf>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em Saúde no Brasil 2003 a 2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. *Boletim Epidemiológico*, v. 50 (n.esp.): 1-154, 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>
- BRIGHTON, S. W.; PROZESKY, O. W.; HARPE A. L. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. *S Afr Med J.*, v. 63, n.9. p. 313-5, 1983.

- BRUEGGEMANN, L. I.; MACKIE, A. R.; MANI, B. K.; CRIBBS, L. L. Differential effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on vascular smooth muscle ion channels may account for differences in cardiovascular risk profiles. *Mol Pharmacol*, v. 76(5):1053-1061, 2009.
- BURGESS, G. M. *et al.* Bradyzide, a potent non-peptide B(2) bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *British journal of pharmacology*, vol. 129: 77-86, 2000.
- BURT, F. J.; CHEN, W.; MINER, J. J.; LENSCHOW, D. J.; MERITS, A.; SCHNETTLER, E.; KOHL, A.; RUDD, P. A.; TAYLOR, A.; HERRERO, L. J.; ZAID, A.; NG, L. F. P.; MAHALINGAM, S. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 4, p. 107–11, 2017.
- BURT, F. J.; ROLPH, M. S.; RULLI, N. E.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M. T. Chikungunya: a re-emerging virus. *Seminars*, v. 379, 2012.
- CASTRO, A. P. C. R.; LIMA, R. A.; NASCIMENTO, J. D. S. Chikungunya: vision of the pain clinician. *Revista Dor*, v. 17, n. 4, p. 299–302, 2016.
- CELICH, K. L. S.; GALON, C. Dor crônica em idosos e sua influência nas atividades da vida diária e convivência social. *Rev Bras Geriatr e Gerontol*, v.12, n.3, p.345–459, 2009.
- CHAAITANYA, I. K.; MURUGANANDAM, N.; SUNDARAM, S. G.; KAWALEKAR, O.; SUGUNAN, A. P.; MANIMUNDA, S. P.; GHOSAL, S. R.; MUTHUMANI, K.; VIJAYACHARI, P. Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. *Viral Immunol*, v. 24 (4): 265-71, 2011.
- CHAGAS, P. M.; FULCO, B. C. W.; SARI, M. H. M.; ROEHRS, J. A.; NOGUEIRA, C. W. Bis(phenylimidazoselenazoly) diselenide elicits antinociceptive effect by modulating myeloperoxidase activity, NOx and NFkB levels in the collagen-induced arthritis mouse model. *J Pharm Pharmacol*, v. 69, n.8, p. 1022-1032, 2017
- CHEN, W.; FOO, S.; TAYLOR, A.; LULLA, A.; MERITS, A.; HUESTON, L.; FORWOOD, M. R.; WALSH, N. C.; SIMS, N. A.; HERRERO, L. J.; MAHALINGAM, S. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya virus Infection. *Journal of Virology*, v. 89, n. 1, p. 581–593, 2015.
- CHOW, A.; HER, Z; ONG, E. K. S.; CHEN, J. M.; DIMATATAC, F.; KWEK, D. J. C.; BARKHAM, T.; YANG, H.; RÉNIA, L.; LEO, Y. S.; NG, L. F. P. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.
- CHRISTRUP, L. L. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v. 41(1 Pt 2):116-22, 1997.
- CLEMETT, D.; GOA, K. L. Celecoxib: a review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain. *Drugs*, v. 59(4):957-80, 2000.
- COBOS, E.J.; GHASEMLOU, N.; ARALDI, D.; SEGAL, D.; DUONG, K.; WOOLF, C.J. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain*, v.153, p.876-884, 2012.
- COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DICKENSON, A.H.; YARNITSKY, D.; FREEMAN, R. TRUINI, A.; ATTAL, N.; FINNERUP, N. B.; ECCLESTON, C.; KALSO, E.; BENNETT, D.L.; DWORKIN, R.H.; RAJA, S.N. Neuropathic pain. *Nature reviews*, v.3, p.1-19, 2017.
- CONSTANT, L. E. C.; RAJSFUS, B. F.; CARNEIRO, P. H.; SISNANDE, T.; MOHANA-BORGES, R.; ALLONSO, D. Overview on Chikungunya Virus Infection: From Epidemiology to State-of-the-Art Experimental Models. *Front Microbiol*. 2021 Oct 5;12:744164.
- COSTA, V. V.; AMARAL, F.; COELHO, F. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MALAGOLI, B. G.; GOMES, J. H. S.; LOPES, F.; SILVEIRA, K. D.; SACHS, D.; FAGUNDES, C. T.; TAVARES, L. D.;

- PINHO, V.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C.; SOUZA, D. G. Lithothamnion muelleri Treatment Ameliorates Inflammatory and Hypernociceptive Responses in Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Plos One*, v. 10, 2015
- COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; VALADÃO, D. F.; CISALPINO, D.; DIAS, A. C. F.; SILVEIRA, K. D.; KANGUSSU, L. M.; AVILA, T. V.; BONFIM, M. R.; BONAVENTURA, D. SILVA, T. A.; SOUSA, L. P.; RACHID, M.; VIEIRA, L. Q.; MENEZES, G. B.; PAULA, A. M.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. A Model of DENV-3 Infection That Recapitulates Severe Disease and Highlights the Importance of IFN- γ in Host Resistance to Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 5, 2012.
- COUDERC, T.; CHRÉTIEN, F.; SCHILTE, C.; DISSON, O.; BRIGITTE, M.; GUIVEL-BENHASSINE, F. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathog*, v. 4, n. 2, 2008.
- COUDERC, T.; GANGNEUX, N.; CHRÉTIEN, F.; CARO, V.; LUONG, T. L.; DUCLOUX, B.; TOLOU, H.; LECUIT, M.; GRANDADAM, M. Chikungunya virus infection of corneal grafts. *Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 6, p. 851–859, 2012.
- CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 8, p. 523–531, 2017.
- CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; Ferreira, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, v. 102, n.5, p. 1755-1760, 2005.
- DAS, T.; HOARAU, J. J.; JAFFAR BANDJEE, M. C.; MAQUART, M.; GASQUE, P. Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. *J Gen Virol*, v. 96(Pt 2):294-310, 2015.
- DELGADO-NOGUERA, M. F.; DELGADILLO, J. M. F.; FRANCO, A. A.; VASQUEZ, J. C.; CALVACHE, J. A. Corticosteroids for septic arthritis in children. *The Cochrane database of systematic reviews* v. 11, 2018,
- DESEURE, K.; COLPAERT, F. C.; ADRIAENSEN, H. Effects of the combined continuous administration of morphine and the high-efficacy 5-HT_{1A} agonist, F 13640 in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *European Journal of Pain*, v. 8, 2004.
- DESEURE, K.; KOEK, W.; COLPAERT, F. C.; ADRIAENSEN, H. The 5-HT_{1A} receptor agonist F 13640 attenuates mechanical allodynia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, v. 456, 2002.
- DI ROSA, M. *et al.* Multiple control of inflammation by glucocorticoids. *Agents Actions*, Basel, v.17, p.284-289, 1985.
- DIONNE, R. A.; LEPINSKI, A. M.; GORDON, S. M.; JABER, L.; BRAHIM, J. S.; HARGREAVES, K. M. Analgesic effects of peripherally administered opioids in clinical models of acute and chronic inflammation. *Clin Pharmacol Ther*, v. 70(1):66-73, 2001.
- DOOLEY, D. J.; DONOVAN, C. M.; MEDER, W. P.; WHETZEL, S. Z. Preferential action of gabapentin and pregabalin at P/Q-type voltage-sensitive calcium channels: Inhibition of K⁺-evoked [3H]-norepinephrine release from rat neocortical slices. *Synapse*, v.45, 2002.
- DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, v.120, n.11, p.3760–3772, 2010.

- DUPUIS-MAGUIRAGA, L.; NORET, M.; BRUN, S.; GRAND, R. L.; GRAS, G.; ROQUES, P. Chikungunya disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 3, 2012.
- DÜRSTELER, C.; MIRANDA, H. F.; POVEDA, R.; MASES, A.; PLANAS, E.; PUIG, M. M. Synergistic interaction between dexamethasone and tramadol in a murine model of acute visceral pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 5: 515-20, 2007.
- DWORKIN, R. H.; CORBIN, A. E.; YOUNG, J. P.; SHARMA, U. LAMOREAUX, L.; BOCKBRADER, H.; GAROFALO, E. A.; POOLE, R. M. Pregabalin for the treatment of postherpetic neuralgia: A randomized, placebo-controlled trial. *Neurology*, 2003.
- ESPOSITO, M.; MALAYIL, R.; HANES, M.; DEER, T. Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Med*, 2019.
- FALSETTA, M. L.; FOSTER, D. C.; WOELLER, C. F.; POLLOCK, S. J.; BONHAM, A. D.; HAIDARIS, C. G.; PHIPPS, R. P. A role for bradykinin signaling in chronic vulvar pain. *J Pain*, 17(11):1183–1197, 2016.
- FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 1996.
- FORNASARI, D. Pain mechanisms in patients with chronic pain. *Clin Drug Investig.*, v. 32. Suppl 1, p. 45-52, 2012.
- FROLOV, R. V.; SINGH, S. Celecoxib and ion channels: a story of unexpected discoveries. *Eur J Pharmacol*, v. 5;730:61-71, 2014.
- FURST S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull*, v.48, n.2, p.129–141, 1999.
- GALÁN-HUERTA, K. A.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; FARFAN-ALE, J. A.; RAMOS-JIMÉNEZ, J. Chikungunya virus: A general overview. *Medicina Universitaria*, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.
- GALVÃO, IZABELA ; VAGO, JULIANA P. ; BARROSO, LIVIA C. ; TAVARES, LUCIANA P. ; QUEIROZ-JUNIOR, CELSO M. ; Costa, Vivian V. ; CARNEIRO, FERNANDA S. ; FERREIRA, TATIANA P. ; SILVA, PATRICIA M. R. ; Amaral, Flávio A. ; Sousa, Lirlândia P. ; Teixeira, Mauro M. . Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. *European Journal of Immunology*, v. 47, p. 585-596, 2017.
- GANESAN V. K.; DUAN B.; REID S. P. Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. *Viruses*, v. 9, n. 368, p. 1-14, 2017.
- GARCIA-LARREA, L. The pathophysiology of neuropathic pain: critical review of models and mechanisms. IASP Press, 2014.
- GARDNER, J.; ANRAKU, I.; LE, T. T.; LARCHER, T.; MAJOR, L.; ROQUES, P. SCHRODER, W. A.; HIGGS, S.; SUHRBIER, A. Chikungunya virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. *Journal of Virology*, v. 84, n. 16, p. 8021–8032, 2010.
- GEIS, C.; GEUSS, E.; SOMMER, C.; SCHMIDT, H.H.H.W.; KLEINSCHNITZ, C. NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. *Experimental Neurology*, v.288, p. 94–103, 2017.
- GÉRARDIN, P.; BARAU, G.; MICHAULT, A.; BINTNER, M.; RANDRIANAIVO, H.; CHOKER, G.; LENGLET, Y.; TOURET, Y.; BOUVERET, A.; GRIVARD, P.; ROUX, K. L.; BLANC, S.; SCHUFFENECKER, I.; COUDERC, T.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; LECUIT, M.; ROBILLARD,

- P. Y. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Medicine*, v. 5, n. 3, p. 0413–0423, 2008.
- GOLD, M.S; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*, v. 16, n.11, p. 1248-1257, 2010.
- GONÇALVES, W. A.; REZENDE, B. M.; DE OLIVEIRA, M. P. E.; RIBEIRO, L. S.; FATTORI, V.; DA SILVA, W. N.; PRAZERES, P. H. D. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; SANTANA, K. T. O.; COSTA, W. C.; BELTRAMI, V. A.; COSTA, V. V.; BIRBRATIR, A.; VERRI, W. A. Jr.; LOPES, F.; CUNHA, T. M.; TEIXEIRA, M. M.; AMARAL, F. A.; PINHO, V. Sensory Ganglia-Specific TNF Expression Is Associated With Persistent Nociception After Resolution of Inflammation. *Front Immunol*, 2020.
- GORE, M.; SADOSKY, A.; TAI, K.; STACEY, B. A Retrospective Evaluation of the Use of Gabapentin and Pregabalin in Patients with Postherpetic Neuralgia in Usual-Care Settings. *Clinical Therapeutics*, v. 29, 2007.
- GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. A Review of Chikungunya virus induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. *The open rheumatology journal*, v. 10, p. 129–140, 2016.
- GRASTILLEUR, S.; MOULEDOUS, L.; BEDEL, J.; ETCHEVERRY, J.; BADER, M.; GIROLAMI, J. P.; MINVILLE, V. Role of kinin B2 receptors in opioid-induced hyperalgesia in inflammatory pain in mice. *Biological Chemistry*, 394(3), 361–368, 2013.
- GRIFFIS, C. A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The Effect of Pain on Leukocyte Cellular Adhesion Molecules. *Biol Res Nurs*, v.7, n.4, p.297–312, 2006.
- GRODZINSKY, A. J.; WANG, Y.; KAKAR, S.; VRAHAS, M. S.; EVANS, C. H.; Intra-articular dexamethasone to inhibit the development of post-traumatic osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 35(3):406-411, 2017.
- GUGINSKI, G. Dor: o que sabemos sobre ela? *Perspectivas online*, v.2, n.7, p.113–121, 2008.
- GUTSTEIN, H. B.; AKIL, H. Analgésicos opioides. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (editors). *GOODMAN & GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica*. 10ª edição, Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2005. p. 427-464.
- HASHIZUME M., HAYAKAWA N., MIHARA M. IL-6 transsignalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17. *Rheumatology*, v. 47, p. 1635–1640, 2008.
- HAWMAN, D. W.; STOERMER, A. K.; MONTGOMERY, S. A.; PAL, P.; OKO, L.; DIAMOND, M. S.; MORRISON, T. E. Chronic Joint Disease Caused by Persistent Chikungunya virus Infection Is Controlled by the Adaptive Immune Response. *Journal of Virology*, v. 87, n. 24, p. 13878 –13888, 2013.
- HEATH, C. J.; LOWTHER, J.; NOEL, T. P.; MARK-GEORGE, I.; BOOTHROYD, D. B.; MITCHELL, G.; MACPHERSON, C.; LABEAUD, A .D. The Identification of Risk Factors for Chronic Chikungunya Arthralgia in Grenada, West Indies: A Cross-Sectional Cohort Study. *Open Forum Infectious Diseases*, v, 5, 2018.
- HEHN, C.A.; BARON, R.; WOOLF, C.J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*, v. 73, p. 638 - 652, 2012.
- HELLEBREKERS, L. J. *Dor em Animais*. São Paulo: Manole Ltda, p.69- 79, 2002.
- HER, Z.; KAM, Y. W.; LIN, R. T. P.; NG, L. F. P. Chikungunya: a bending reality. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 14–15, p. 1165–1176, 2009.

- HOARAU, J. J.; JAFFAR-BANDJEE, M.; TROTOT, P. K.; DAS, T.; LI-PAT-YUEN, G.; DASSA, B.; DENIZOT, M.; GUICHARD, E.; RIBERA, A.; HENNI, T.; TALLET, F.; MOITON, M. P.; GAUZERE, B. A.; BRUNIQUET, S.; BANDJEE, Z. J.; MORBIDELLI, P.; MARTIGNY, G.; JOLIVET, M.; GAY, F.; GRANDADAM, M.; TOLOU, H.; VIEILLARD, V.; DEBRE, P.; AUTRAN, B.; GASGUE, P. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010.
- HUA, C.; COMBE, B. Chikungunya virus-Associated Disease. *Curr Rheumatol Rep*, v. 19, n. 11, p. 69, 2017.
- INGLIS, F. M.; LEE, K. M.; CHIU, K. B.; PURCELL, O. M.; DIDIER, P. J.; RUSSELL-LODRIGUES, K.; WEAVER, S. C.; ROY, C. J.; MACLEAN, A. G. Neuropathogenesis of Chikungunya Infection: Astrogliosis and Innate Immune Activation. *J Neurovirol*, v. 22(2): 140–148, 2016.
- INOUE, N.; ITO, S.; TAJIMA, K.; NOGAWA, M.; TAKAHASHI, Y.; SASAGAWA, T.; NAKAMURA, A.; KYOI, T. Etodolac attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *J Pharmacol Sci*, v. 109(4):600-5, 2009.
- JI, R. R.; DONNELLY, C. R.; NEDERGAARD, M. Astrocytes in chronic pain and itch. *Nat Rev Neurosci*, 2019.
- JIANG, S. P.; ZHANG, Z. D.; KANG, L. M.; WANG, Q. H.; ZHANG, L.; CHEN, H. P. Celecoxib reverts oxaliplatin-induced neuropathic pain through inhibiting PI3K/Akt2 pathway in the mouse dorsal root ganglion. *Exp Neurol*, 2016.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v.413, n.6852, p.203–10, 2001.
- KAWABATA A. Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 34(8):1170-3, 2011.
- KELVIN, A. A.; BANNER, D.; SILVI, G.; MORO, M. L.; SPATARO, N.; GAIBANI, P.; CAVRINI, F.; PIERRO, A.; ROSSINI, G.; CAMERON, M. J.; BERMEJO-MARTIN, J. F.; PAQUETTE, S. G.; XU L, DANESH A, FAROOQUI A, BORGHETTO I, KELVIN DJ, SAMBRI V, RUBINO S. Inflammatory cytokine expression is associated with chikungunya virus resolution and symptom severity. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5, n. 8: e1279, 2011.
- KIGUCHI, N. et al. CC-chemokine MIP-1alpha in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. *Neurosci Lett*, v. 484, n. 1, p. 17-21, 2010.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*, v. 13, n. 1, 2008.
- LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of Pain. *Vet Clin North Am Small*, v.30, n.4, p.703–728, 2000.
- LEE Y.; CHAPLANA, S. R.; YAKSH, T. L. Systemic and supraspinal, but not spinal, opiates suppress allodynia in a rat neuropathic pain model. *Neuroscience Letters*, v., 199, 1995.
- LEE, I. O.; SEO, Y. The effects of intrathecal cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, or nonselective inhibitors on pain behavior and spinal Fos-like immunoreactivity. *Anesth Analg*, 2008.
- LEISENGANG, S.; OTT, D.; MURGOTT, J.; GERSTBERGER, R.; RUMMEL, C.; ROTH, J. Primary cultures from rat dorsal root ganglia: responses of neurons and glial cells to somatosensory or inflammatory stimulation. *Neuroscience*, 2018.

- LIDBURY, B. A.; RULLI, N. E.; SUHRBIER, A.; SMITH, P. N.; MCCOLL, S. R.; CUNNINGHAM, A. L.; TARKOWSKI, A.; VAN ROOIJEN, N.; FRASER, R. J.; MAHALINGAM S. Macrophage-derived proinflammatory factors contribute to the development of arthritis and myositis after infection with an arthrogenic alphavirus. *J Infect Dis*, v. 1;197(11):1585-93, 2008.
- LINLEY, J. E. et al. Understanding inflammatory pain: Ion channels contributing to acute and chronic nociception. *Pflugers Arch*, v.459, n.5, p.657–669, 2010.
- LIU, S.H.M.; XIA, L. J. The influence of thiamin on the efficacy of pregabalin in rats with spinal nerve ligation (SNL) - induced neuropathic pain. *Neurological Research*, v. 38, p.717-724, 2016.
- LORSCHIEDER, M.; TSAPIS, N.; UR-REHMAN, M.; GAUDIN, F.; STOLFA, I.; ABREU, S.; MURA, S.; CHAMINASE, P. ESPELI, M.; FATTAL, E. Dexamethasone palmitate nanoparticles: An efficient treatment for rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release*, 2019.
- MACHADO, Angelo B.M.; HAERTEL, Lúcia Machado. *Neuroanatomia funcional*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2013.
- MACHELSKA, H.; CELIK, M. Opioid Receptors in Immune and Glial Cells-Implications for Pain Control. *Frontiers in Immunology*, v. 4;11:300, 2020.
- MANIMUNDA, S. P.; VIJAVACHARI, P.; UPPOOR, R.; PURUSHOTTAMAN, S.; SINGH, S. S.; RAI, S. K.; SUDEEN, A.B.; MURUGANANDAM, N.; CHAITANYA, I. K.; GURUPRASAD, D. R. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010.
- MATHEW, A. J.; GANAPATI, A.; KABEERDOSS, J.; NAIR, A.; GUPTA, N.; CHEBBI, P.; MANDAL, S. K.; DANDA, D. Chikungunya Infection: a Global Public Health Menace. *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 17, n. 2, p. 1–9, 2017.
- MEACHAM, K.; SHEPHERD, A.; MOHAPATRA, D.P.; HAROUTOUNIAN, S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Current Pain Headache Reports*, v.6, p. 21-28, 2017.
- MESSLINGER, K. Was ist ein Nozizeptor? *Der Anaesthesist*, v.46, n.142–153, 1997.
- MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, v. 10, n. 1, p. 23-36, Jan 2009.
- MIRANDA, C. C. V.; SEDA JUNIOR, L. F.; PELLOSO, L. R. C. A. New physiological classification of pains: current concept of neuropathic pain. *Rev Dor*, v.17, s.1, p.3–4, 2016.
- MIRANDA, H. F.; NORIEGA, V.; SIERRALTA, F.; POBLETE, P.; ARANDA, N.; PRIETO, J. C. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Tonic, Phasic and Inflammatory Mouse Models. *Drug Res*, v. 69(10):572-578, 2019.
- MIRANDA, H. F.; PUIG, M. M.; PRIETO, J. C.; PINARDI, G. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain*, v. 121(1-2):22-8, 2006.
- MORIN, N. et al. Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J Neuroimmunol*, v. 184, n. 1-2, p. 164- 71, 2007.
- MOTA, M. T. O.; COSTA, V. V.; SUGIMOTO, M. A. *et al.* In-depth characterization of a novel live-attenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease. *Sci Rep* 10, 5306, 2020.
- NAKAYA, H. I.; GARDNER, J.; POO, Y. S.; MAJOR, L.; PULENDRAN, B.; SUHRBIER, A. Gene profiling of Chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 64, n. 11, p. 3553–3563, 2012.

- NARAZAKI, M.; TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017.
- NAZEMIAN, V.; SHADNOUSH, M.; MANAHEJI, H.; ZARINGHALAM, J. Probiotics and Inflammatory Pain: A literature review study. *Middle East Journal of Rehabilitation and Health*, v. 3, p. 1 - 11, 2016.
- NEELAKANDAN, Y.; VENKATESAN, A. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of sulfated polysaccharide fractions from *Sargassum wightii* and *Halophila ovalis* in male Wistar rats. *Indian J Pharmacol*, v. 48, n. 5, p. 562-570, 2016.
- NG, L. C.; HAPUARACHCHI, H. C. Tracing the path of Chikungunya virus Evolution and adaptation. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 10, n. 7, p. 876–885, 2010.
- NG, L. F. P. Immunopathology of Chikungunya virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Annual Review of Virology*, v. 4, n. jun., p. 5.1-5.15, 2017.
- NICKEL, F.T.; SEIFERT, F.; LANZ, S.; MAIHÖFNER, C. Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*, v. 22, p. 81 - 91, 2012.
- NISHIYAMA, T. Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2006.
- NORET M.; HERRERO L.; RULLI N.; ROLPH M.; SMITH P. N.; LI R. W.; ROQUES P.; GRAS G.; MAHALINGAM S. Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by Chikungunya virus infected human osteoblasts. *J Infect Dis*, v. 206, n. 1, p. 455--9, 2012.
- OLIVEIRA, C. M. B.; TSA, R. K. S.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Cytokines and pain. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 2011.
- OLIVEIRA, S. M.; SILVA, C. R.; WENTZ, A. P.; PAIM, G. R.; CORREA, M. S.; BONACORSO, H. G.; PRUDENTE, A. S.; OTUKI, M. F.; FERREIRA, J. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. WHO guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. 172 p, 2012.
- OSTA, B.; ROUX, J. P.; LAVOCAT, F.; PIERRE, M.; NDONGO-THIAM, N. BOIVIN, G.; MIOSSEC, P. Differential Effects of IL-17A and TNF- α on Osteoblastic Differentiation of Isolated Synoviocytes and on Bone Explants from Arthritis Patients. *Front Immunol*, v. 6, n. 151, 2015.
- PAROLA, P.; LAMBALLERIE, X.; JOURDAN, J.; ROVERY, C.; VAILLANT, V.; MINODIER, P.; BROUQUI, P.; FLAHAUT, A.; RAOULT, D.; CHARREL, R. N. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 10, p. 1493–1499, 2006.
- PATRONO, C.; PATRIGNANI, P.; GARCIA RODRIGUEZ, L. A. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *Journal of Clinical Investigation*, v. 108(1):7-13, 2001.
- PAVLOVIC, V.; DIMIC, A.; MILENKOVIC, S.; KRTINIC, D.; ALEKSIC, I. Relation between bone mineral density and IL-17 serum levels in Serbian patients with early Rheumatoid arthritis. *De Gruyter Open*, v. 10, p. 106-112, 2015.
- PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience*, v. 101, n. 3, p. 745-57, 2000.

- POO, Y. S.; RUDD, P. A.; GARDNER, J.; et al. Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic Chikungunya virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*; v. 8, n. e3354, 2014
- PORTA, C.; LARA-MAYORGA, I. M.; NEGRETE, R.; MALDONADO, R. Effects of pregabalin on the nociceptive, emotional and cognitive manifestations of neuropathic pain in mice. *European Journal of Pain*, v. 20, 2016.
- QUADROS, A. U.; PINTO, L. G. P.; FONSECA, M. M.; KUSUDA, R.; CUNHA, F. Q.; CUNHA, T. M. Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. *Scientific Reports*, 2015.
- REZENDE, R. M.; PAIVA-LIMA, P.; DOS REIS, W. G.; CAMELO, V. M.; FARACO, A.; BAKHLE, Y. S.; FRANCISCHI, J. N. Endogenous opioid and cannabinoid mechanisms are involved in the analgesic effects of celecoxib in the central nervous system. *Pharmacology*, v. 89(3-4):127-36, 2012.
- RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; CARDONA-OSPINA, J. A.; URBANO-GARZÓN, F. S.; HURTADO-ZAPATA S. J. Prevalence of Post-Chikungunya Infection Chronic Inflammatory Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis Care Res*, v. 68(12):1849-1858, 2016.
- ROHATGI, A.; CORBO, J. C.; MONTE, K.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L.; KARDON, G.; LENSCHOW, D. J. Infection of Myofibers Contributes to Increased Pathogenicity during Infection with an Epidemic Strain of chikungunya virus. *Journal of Virology*, v. 88, n. 5, p. 2414–2425, 2014.
- ROOSENHOFF, R.; ANFASA, F.; MARTINA, B. The pathogenesis of chronic chikungunya: evolving concepts. *Future Virology*, v. 11, n. 1, p. 61–77, 2016.
- RULLI, N. E.; Guglielmotti, A.; MANGANO, G.; ROLPH, M. S.; APICELLA, C.; ZAID, A.; SUHRBIER, A.; MAHALINGAM, S. Amelioration of alphavirus-induced arthritis and myositis in a mouse model by treatment with bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. *Arthritis and Rheumatism*, v. 60, n. 8, p. 2513–2523, 2009.
- RULLI, N. E.; ROLPH, M. S.; SRIKIATKHACHORN, A.; ANANTAPREECHA, S.; GUGLIELMOTTI, A.; MAHALINGAM, S. Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute Chikungunya virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 204, n. 7, p. 1026–1030, 2011.
- SACHS, D.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; LOPES, F.; PINHO, V.; AMARAL, F. A.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, A. L.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *Br J Pharmacol* v. 162, n. 1; p. 72-83, 2011.
- SALTER, M. W. Cellular Signalling Pathways of Spinal Pain Neuroplasticity as Targets for Analgesic Development. *Curr Top Med Chem*, v.5, p.557–567, 2005.
- SANTOS, F. M.; DIAS, R. S.; OLIVEIRA, M. D.; ALVES, I. C. T.; FERNANDES, L. D.; PESSOA, C. R.; DA MATTA, S. L. P.; COSTA, V. V.; SOUZA, D. G.; SILVA, C. C.; DE PAULA, S. O. Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2019.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, v. 5, p. 1062-1067, 2002.
- SCHWAMEIS, M.; BUCHTELE, N.; WADOWSKI, P. P.; SCHOERGENHOFER, C.; JILMA, B. Chikungunya vaccines in development. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, v. 12, n. 3, p. 716–731, 2016.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of Chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.

SEGOND VON BANCHET, G.; BOETTGER, M. K.; FISCHER, N.; GAJDA, M.; BRÄUER, R.; SCHAIBLE, H. G. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor- α -dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain*, 2009.

SEPÚLVEDA-DELGADO, J.; VERA-LASTRA, O. L.; TRUJILLO-MURILLO, K.; CANSECO-ÁVILA, L. M.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, R. A.; GÓMEZ-CRUZ, O.; LUGO-TRAMPE, A.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; DANIS-LOZANO, R.; CONTRERAS-CONTRERAS, A.; MENDOZA-TORRES, A.; DOMÍNGUEZ-ARREVILLAGA, S.; MENA-VELA, B. A.; OCAÑA-SIBILLA, M.; RAMÍREZ-VALDESPINO, J. C.; JARA, L. J. Inflammatory biomarkers, disease activity index, and self-reported disability may be predictors of chronic arthritis after chikungunya infection: brief report. *Clin Rheumatol*, 2017.

SEYMOUR, R. L.; ADAMS, A. P.; LEAL, G.; ALCORN, M. D.; WEAVER, S. C.; A rodent model of Chikungunya virus infection in RAG1 $-/-$ mice, with features of persistence, for vaccine safety evaluation. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, 2015.

SHAW, O. M.; HARPER, J. L. Bradykinin receptor 2 extends inflammatory cell recruitment in a model of acute gouty arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011.

SILVA, J. A.; RIBEIRO-FILHO, N. P. A dor como um problema psicofísico. *Rev Dor*, v.12, n.2, p.138–151, 2011.

SIMMONS, G.; BRÉS, V.; LU, K.; LISS, N. M.; BRAMBILLA, D.; RYFF, K. R.; BRUHN R.; VELEZ, E.; CAMPO, D.; LINNEN, J. M.; LATONI, G.; PETERSEN, L. R.; Williamson, P. C.; BUSCH, M. P. High incidence of chikungunya virus and frequency of viremic blood donations during epidemic, Puerto Rico, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 7, p. 1221–1228, 2016.

SIMON, L. S. COX-2 inhibition: an advance or only pharmaceutical “hype”? *Arthritis Care & Research*, 2001.

SISSOKO, D.; MALVY, D.; EZZEDINE, K.; RENAULT, P.; MOSCETTI, F.; LEDRANS, M.; PIERRE, V. Post-epidemic chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2009.

SOUZA, D. G.; FAGUNDES, C. T.; SOUSA, L. P.; AMARAL, F. A.; SOUZA, R. S.; SOUZA, A. L.; KROON, E. G.; SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; BUKIN, E.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 14138-14143, 2009.

STAIKOWSKY, F.; TALARMIN, F. O.; GRIVARD, P.; SOUAB, A.; SCHUFFENECKER, I.; LE ROUX, K.; LECUIT, M.; MICHAULT, A. Prospective study of chikungunya virus acute infection in the Island of La Réunion during the 2005-2006 outbreak. *PLoS ONE*, v. 4, n. 10, 2009.

STEIN, C.; COMISEL, K.; HAIMERL., E. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *New England Journal of Medicine*, v. 325:1123-1126, 1991.

SUN, Y. H.; DONG, Y. L.; WANG, Y. T.; ZHAO, G. L.; LU, G. L.; YANG, J.; WU, S. X.; GU, Z. X.; WANG, W. Synergistic analgesia of duloxetine and celecoxib in the mouse formalin test: a combination analysis. *PLoS One*, v. 7, 2013.

TAKASAKI, I.; KURIHARA, T.; SAEGUSA, H.; ZONG, S.; TANABE, T. Effects of glucocorticoid receptor antagonists on allodynia and hyperalgesia in mouse model of neuropathic pain, *European Journal of Pharmacology*, v. 524, 2005.

TENG, T. S.; KAM, Y. W.; LEE, B.; HAPUARACHCHI, H. C.; WIMAL, A.; NG, L. C.; NG, L. F. P. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute Chikungunya virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 12, p. 1925–1935, 2015.

TENTI, S.; PASCARELLI, N. A.; CHELESCHI, S.; GUIDELLI, G. M.; FIORAVANTI, A. The Emerging Role of Bradykinin in the Pathogenesis of Osteoarthritis and its Possible Clinical Implications. *Curr Rheumatol Rev*, 2016.

TSAI, Y.; WON, S.; LIN, M. Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury. *Pain*, v. 88, 2000.

- VERMA, V.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Pregabalin in Neuropathic Pain: Evidences and Possible Mechanisms. *Current Neuropharmacology*, v. 12, p. 44-56, 2014.
- VICENTE-BAZ, J.; LOPEZ-GARCIA, J.; RIVERA-ARCONADA, I. Implication of Kv7 Channels in the Spinal Antinociceptive Actions of Celecoxib. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2019.
- VON BANCHET, G. S.; PETROW, P.K.; BRÄUER, R. *et al.* Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. *Arthritis Res Ther*, v. 2, 2000.
- WAHID, B.; ALI, A.; RAFIQUE, S.; IDREES, M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 58, p. 69–76, 2017.
- WANG, S.; HUAN, W.; NIE, H.; BU, G.; SHEN, WANG, H. The efficacy of pregabalin for acute pain control in herpetic neuralgia patients: A meta-analysis. *Medicine*, v. 96, 2017.
- WANG, T.; YIN, D.; GUO, W.; LIU, Y.; LI, Y.; WQ, W.; HAN, W.; HONG, Z.; HUANG, Z. Antinociceptive and hypnotic activities of pregabalin in a neuropathic pain-like model in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 135, 2015.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med*, v. 372, p. 1231–1239, 2015.
- WEI, S. T.; SUN, E. Y. H.; ZONG, B. S. H.; XIAN, Y. B. Serum Levels of IL-6 and TNF- α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. *Med Sci Monit*, v. 21, p. 4030–4038, 2015.
- World Health Organization. Guidelines on Clinical Management of Chikungunya Fever: WHO; 2017 [Acesso em 19/02/2020]. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
- YANG, Y.; LEECH, M.; HUTCHINSON, P. *et al.* Antiinflammatory Effect of Lipocortin 1 in Experimental Arthritis. *Inflammation*, v. 21, 583–596, 1997.
- YU, R.; SONG, D.; DUBOIS, D. C.; ALMON, R. R.; JUSKO, W. K. Modeling Combined Anti-Inflammatory Effects of Dexamethasone and Tofacitinib in Arthritic Rats. *The AAPS Journal*, v. 21(5):93, 2019.
- 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, 2016.
- ZHANG, R.; KIM, A. S.; FOX, J. M.; NAIR, S.; BASORE, K.; KLIMSTRA, W. B.; RIMKUNAS, R.; FONG, R. H.; LIN, H.; PODDAR, S.; CROWE, J. E.; JR, DORANZ; B. J.; FREMONT, D. H.; DIAMOND, M. S. MXRA8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, 557(7706),570–574, 2018.
- ZHOU, G.; MA, L.; JING, H. A meta-analysis of dexamethasone for pain management in patients with total knee arthroplasty. *Medicine*, v. 97(35):e11753, 2018.
- ZILIOX, L.A. Neuropathic pain. *Continuum*, v. 23, n. 2, p.512-532, 2017.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES

Artigos completos publicados em periódicos

[*Em preparação*] SOUSA, C. D. F.; **MOREIRA, T. P.**; SANTOS, F. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; COSTA, V. V.; SOUZA, D. G. Key role of CCR2-expressing macrophages in a mouse model of Chikungunya virus-induced hypernociception.

[*Em submissão*] **MOREIRA, T. P.**; SOUSA, C. D. F.; COSTA, V. R. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; SANTOS, F. M.; ESPER, L. M.; VIEIRA, L. Q.; NOGUEIRA, M. L.; CUNHA, T. M.; TEIXEIRA, M. M.; COSTA, V. V.; SOUZA, D. G. Tumor necrosis factor play a deleterious role in the pathogenesis of chikungunya virus infection in mice.

[*Em submissão*] SANTOS, F. M.; **MOREIRA, T. P.**; SOUSA, C. D. F.; COSTA, V. R. M.; PASSOS, I. B. S.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; SOUZA, D. G. TEIXEIRA, M. M.; COSTA, V. V. Mayaro virus infection induces inflammatory response in osteoclast and osteoblast and triggers bone loss: Role of CCL2 chemokine and its receptor (CCR2).

[*Em submissão*] ARAUJO, S.; COSTA, V. R. M.; SANTOS, F. M.; SOUSA, C. D. F.; **MOREIRA, T. P.**; GONÇALVE, M. R.; FELIX, F. B.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; CAMPOLINA-SILVA, G. H.; BONILHA, C. S.; SUGIMOTO, M. A.; SOUZA, D. G.; COSTA, V. V.; TEIXEIRA, M. M. AnxA1-Fpr2/ALX signaling axis regulates acute inflammation in chikungunya virus infection.

COSTA, V. V.; SUGIMOTO, M. A.; HUBNER, J.; PEREIRA, M. H. G.; CHEN, J.; GOBBETTI, T.; RODRIGUES, G. O.; BAMBIRRA, J. L.; PASSOS, I.; QUEIROZ, C. M.; LOPES, C. E. M.; **MOREIRA, T. P.**; BONJOUR, K.; MELO, R. C. N.; OLIVEIRA, M. A. P.; ANDRADE, M. V. M.; SOUSA, L. P.; SOUZA, D. G.; SANTIAGO, H. C.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Annexin A1-FPR2/ALX pro-resolving pathway in dengue disease: novel therapeutic target and potential marker of disease severity. *Elife*. 2022 Mar 16;11:e73853.

MOTA, M. T. O.; COSTA, V. V.; GUIMARÃES, G. F.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; **MOREIRA, T. P.**; SOUSA, C. D. F.; SANTOS, F. M.; SUGIMOTO, M. A.; QUEIROZ, V. F.; PASSOS, I.; HUBNER, J.; SOUZA, D. G.; WEAVER, S. A.; TEIXEIRA, M. M.; NOGUEIRA, M. L. In-depth characterization of a novel live-attenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease. *Scientific Reports*, 10:5306, 2020.

CAMARGOS, V. N.; FOUREAUX, G.; MEDEIROS, D. C.; DA SILVEIRA, V. T.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MATOSINHOS, A. L. B.; FIGUEIREDO, A. F. A.; SOUSA, C. D. F.; **MOREIRA, T. P.**; QUEIROZ, V. F.; DIAS, A. C. F.; SANTANA, K. T. O.; PASSOS, I.; REAL, A. L. C. V.; SILVA, L. C.; MOURÃO, F. A. G.; WNUK, N. T.; OLIVEIRA, M. A. P.; MACARI, S.; SILVA, T.; GARLET, G. P.; JACKMAN, J. A.; SORIANI, F. M.; MORAES, M. F. D.; MENDES, E. M. A. M. *et al.* In-depth characterization of congenital zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. *EBIOMEDICINE*, v. 44, p. 516-529, 2019.

JACKMAN, J. A.; COSTA, V. V.; PARK, S.; REAL, ANA LUIZA C. V.; PARK, J. H.; CARDOZO, P. L.; FERHAN, A. R.; OLMO, I. G.; **MOREIRA, T. P.**; BAMBIRRA, J. L.; QUEIROZ, V. F.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; FOUREAUX, G.; SOUZA, DANIELLE G.; RIBEIRO, F. M.; YOON, B. K.; WYNENDAELE, E.; DE SPIEGELEER, B.; TEIXEIRA, M. M.; CHO, N. Therapeutic treatment of zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. *Nature Materials*, v. 17, p. 971-977, 2018.

Capítulos de livros publicados

SUGIMOTO, M. A.; **MOREIRA, T. P.**; COSTA, V. V.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Fármacos antivirais e antirretrovirais. Livro-texto de Farmacologia. Ateneu, 2020.

Apresentação de Trabalho

CAMARGOS, V. N.; FOUREAUX, G.; MEDEIROS, D. C.; DA SILVEIRA, V. T.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MATOSINHOS, A. L. B.; FIGUEIREDO, A. F.A.; SOUSA, C. D. F.; **MOREIRA, T. P.**; QUEIROZ, V. F. *et al.* Early prenatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in adult offspring. Fourth 5 International Symposium on Inflammatory Diseases - INFLAMMA IV, 2018, Belo Horizonte – MG

MOREIRA, T. P.; COSTA, V. R. M.; SANTOS, F. M.; SOUSA, C. D. F.; PASSOS, I. B. S.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; VIEIRA, L.Q. TEIXEIRA, M. M.; COSTA, V. V.; SOUZA, D. G. Tumor necrosis factor-alpha is involved in the genesis and maintenance of hypernociception induced by chikungunya virus. Fifth International Symposium on Inflammatory Diseases 2019 - INFLAMMA V, Ribeirão Preto - SP.

ARAÚJO, S.; **MOREIRA, T. P.**; SOUSA, C. D. F.; SANTOS, F. M.; COSTA, V. R. M.; GONÇALVES, M. R.; COSTA, V. V.; TEIXEIRA, M. M. Annexin-a1 as a novel pro resolving molecule against chikungunya virus infection. FAMERP-UTMB. 2019, São José do Rio Preto, SP.

ARAÚJO, S.; **MOREIRA, T. P.**; SOUSA, C. D. F.; SANTOS, F. M.; COSTA, V. R. M.; GONÇALVES, M. R.; COSTA, V. V.; TEIXEIRA, M. M. Activation of platelet activating factor receptor or the 5-lipoxygenase pathway does not impact the course of disease induced by Chikungunya virus. FAMERP-UTMB. 2019, São José do Rio Preto, SP.

SANTOS, F. M.; **MOREIRA, T. P.**; SOUSA, C. D. F.; COSTA, V. R. M.; PASSOS, I. B. S.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; SOUZA, D. G. TEIXEIRA, M. M.; COSTA, V. V. Mayaro virus infection induces inflammatory response in osteoclast and osteoblast and triggers bone loss: Role of CCL2 chemokine and its receptor (CCR2). FAMERP-UTMB. 2019, São José do Rio Preto, SP.

Educação

Palestra: **MOREIRA, T. P.** Febre chikungunya: da biologia do vírus à fisiopatologia da doença. Palestra no Centro Universitário UNA, Campus Barreiro (MG), 2018.

Palestra: **MOREIRA, T. P.** Cultura celular – Conceitos e técnicas. Palestra na disciplina “Tecnologia do cultivo de células e tecidos”, curso técnico em Biotecnologia, Colégio técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC), Belo Horizonte, 2019.

Palestra: **MOREIRA, T. P.** Cultura celular – Titulação viral e cultivo de células primárias.

Palestra na disciplina “Tecnologia do cultivo de células e tecidos”, curso técnico em Biotecnologia, Colégio técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC), Belo Horizonte, 2019.

Palestra: **MOREIRA, T. P.** Cultura celular – Conceitos, técnicas e aplicações. Palestra na disciplina “Tecnologia do cultivo de células e tecidos”, curso técnico em Biotecnologia, Colégio técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC), Belo Horizonte, 2020.

Organização de eventos científicos

SOUZA, D. G.; **MOREIRA, T. P.**; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; CUNHA, T. M.; ALVES FILHO, J. C. F.; SOUSA, C. D. F.; BRITO, C. B.; CAMARGOS, V. N. Fourth International Symposium on Inflammatory Diseases - INFLAMMA IV. 2018.