



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KELLY MEGUMI YAEKASHI

**MARESINA 2 (MAR2) REDUZ DOR ARTICULAR E
ATIVAÇÃO NEURONAL EM MODELO DE DOR INDUZIDOS
PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA INATIVADO E SUA PROTEÍNA
RECOMBINANTE E2 EM CAMUNDONGOS**

KELLY MEGUMI YAEKASHI

**MARESINA 2 (MAR2) REDUZ DOR ARTICULAR E
ATIVAÇÃO NEURONAL EM MODELO DE DOR INDUZIDOS
PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA INATIVADO E SUA PROTEÍNA
RECOMBINANTE E2 EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior.

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Y12m Yaekashi, Kelly Megumi.
Maresina 2 (MaR2) reduz dor articular e ativação neuronal em modelo de dor induzido pelo vírus Chikungunya inativado e sua proteína recombinante E2 em camundongos / Kelly Megumi Yaekashi. - Londrina, 2024.
77 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Chikungunya - Tese. 2. Maresina 2 - Tese. 3. Hiperalgésia - Tese. 4. Canal TRPV1 e TRPA1 - Tese. I. Aparecido Verri Junior, Waldiceu. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

KELLY MEGUMI YAEKASHI

**MARESINA 2 (MAR2) REDUZ DOR ARTICULAR E
ATIVACÃO NEURONAL EM MODELO DE DOR INDUZIDOS
PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA INATIVADO E SUA PROTEÍNA
RECOMBINANTE E2 EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri
Júnior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Mariana Bertozzi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Victor Fattori
Boston Children's Hospital Medical School –
EUA

Londrina, 25 de março de 2024.

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã, pois é graças a eles que hoje posso concluir esse objetivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, aos meus pais, Margarete e Washington, por todo apoio, sabedoria e incentivo que recebi ao longo dessa trajetória, desde os tempos de escola, durante a época da graduação e agora durante a pós-graduação. Minhas conquistas, com certeza, também são suas. Muito Obrigada!

À Karina, que é mais que uma irmã, é a minha melhor amiga, em tempos bons e ruins sempre está ao meu lado, dando os seus conselhos, mostrando o que é o certo e o errado, e como posso melhorar como pessoa. Muito Obrigada!

Aos meus tios, Célia e Roberto, e aos meus primos Luana e Lucas, que sempre me apoiaram nessa longa jornada.

Às minhas amigas de longa data, Débora e Luana, por estarem sempre ao meu lado, parabenizando pelas minhas conquistas, dando conselhos e me apoiando.

Ao meu orientador, Waldiceu Aparecido Verri Jr., pela oportunidade de fazer parte desse laboratório. Agradeço por todo o conhecimento e direcionamento científico que me foi dado.

Aos meus amigos que o LADINC me trouxe, Amanda, Beatriz, Fernanda Rasquel, Geovana, Jéssica, Kassyo, Mariana Bertozzi, Matheus, Maiara, Thaila e aos demais, que contribuíram para elaboração desse trabalho e sempre estiveram disponíveis para esclarecer minhas dúvidas e ajudar quando necessário. Em especial a Mariana Stinglin, que nunca mediu esforços para ajudar em meus experimentos.

Ao Matheus e Maiara, que me acolheram quando entrei no laboratório. Mesmo com o cronograma cheio de tarefas a serem realizadas, me cederam um pouco do seu tempo, tendo a paciência de me ensinar procedimentos e técnicas utilizadas nos experimentos, por me explicar o certo e o errado, me auxiliando na construção desse trabalho e principalmente pelo apoio durante essa jornada na pós-graduação.

Aos animais, que tiveram sua curta existência dedicada à ciência.

Por fim. Agradeço aos órgãos de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária, CAPES e FINEP.

RESUMO

YAEKASHI, K. M. **Maresina 2 (MaR2) reduz dor articular e ativação neuronal induzidos pelo vírus Chikungunya inativado e sua proteína recombinante E2 em camundongos.** 2024. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

O vírus Chikungunya (CHIKV), desencadeia sintomas que normalmente são solucionados pelo próprio sistema imunológico, porém é na fase crônica que os pacientes mais sofrem. A artrite crônica de Chikungunya (ACC), gera implicações econômicas e sociais, incluindo o impacto na qualidade de vida dos pacientes infectados, pela perda da mobilidade e da produtividade econômica. ACC é normalmente confundida com a artrite reumática (AR), devido às similaridades clínicas, sendo assim, medicados com AINES ou opioides, que a longo prazo podem gerar efeitos colaterais, prejudiciais para o organismo. Dessa forma, a busca por moléculas que sejam mais efetivas e com menos efeitos colaterais se faz necessárias. Os mediadores lipídicos pró-resolução especializados (SPMs) são moléculas produzidas durante a fase de resolução da inflamação e possuem atividade pró-resolutiva e analgésica. A Maresina 2 (MaR2) um SPM, derivado do ácido graxo ômega-3, exibe efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, com capacidade de modular atividade dos canais iônicos TRPV1 e TRPA1 dos nociceptores. O objetivo desse estudo foi de investigar o potencial analgésico da MaR2 em modelo de dor articular e ativação neuronal induzido pelo vírus CHIKV inativado (100 UFF/10 μ L) e a sua proteína envelope recombinante E2 (rE2) (100ng/10 μ L) pela via intra-articular (i.a.), além de confirmar e avaliar se os canais TRPA1 e TRPV1 apresentam alguma relação com a formação da hiperalgesia durante a infecção e se o lipídio é capaz de modular essa ativação. CHIKVi e E2 induzem hiperalgesia mecânica e térmica nos camundongos Swiss e esse estado consegue ser reduzido ao ser tratado com 10 ng de MaR2, via intratecal (i.t.), demonstrando o seu efeito analgésico. Para verificar como a parte neuronal está envolvida na formação da hiperalgesia, foi realizada a técnica de imageamento de cálcio, *in vitro*, com gânglio da raiz dorsal (DRG). Observou que os neurônios estimulados com CHIKVi tiveram um influxo de cálcio maior, quando comparado com o Mock (grupo controle) e isso se dá pela capacidade do vírus de modular a atividade dos canais TRPV1 e TRPA1, apresentando um influxo muito maior quando esses canais eram ativados. Quando foram pré-tratados com a MaR2, o influxo de cálcio reduziu mesmo na presença do CHIKVi e dos agonistas para TRPV1 e TRPA1. A imunofluorescência, *in vivo*, demonstrou a intensidade de fluorescência maior em DRG de animais estimulados com o vírus inativado, afirmando a capacidade do CHIKVi em agir diretamente na ativação dos canais iônicos para gerar a hiperalgesia. Esse estado foi revertido quando tratados com a MaR2, pela capacidade desse lipídio de reduzir/ inibir a ativação dos ambos os canais, o que leva a sua ação analgésica. Já se sabe que CHIKVi e rE2 tem capacidade em modular a atividade do canal TRPV1, porém ainda não há dados para TRPA1. Com os resultados *in vitro* e *in vivo*, há possibilidade do TRPA1 de ter a sua ativação modulada pelo vírus. Para confirmar isso, a hiperalgesia mecânica foi realizada em animais induzidos com CHIKVi ou rE2 e tratados após uma hora, via i.t., com o HC-030031, antagonista seletivo do TRPA1. Ao bloquear o canal, a hiperalgesia mecânica foi reduzida, demonstrando a relação do canal iônico na formação da hiperalgesia.

Palavras-chaves: Chikungunya; Hiperalgisia; Maresina 2; Canal TRPV1 e TRPA1.

ABSTRACT

YAEKASHI, K. M. **Maresin 2 reduces articular pain and neuronal activation induced by inactivated Chikungunya virus and its protein E2 in mice.** 2024. 77f. Master's degree (Dissertation in Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Paraná, 2024.

The Chikungunya virus (CHIKV) triggers symptoms that are normally resolved by the immune system itself, but it is in the chronic phase that patients suffer most. Chronic Chikungunya arthritis (CCA) generates economic and social implications, including the impact on the quality of life of infected patients through loss of mobility and economic productivity. ACC is normally confused with rheumatoid arthritis (RA), due to clinical similarities; therefore, medication is taken with NSAIDs or opioids, which in the long term can generate side effects that are harmful to the body. Therefore, the search for molecules that are more effective and with fewer side effects is necessary. Specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs) are molecules produced during the resolution phase of inflammation and have pro-resolving and analgesic activity. Maresin 2 (MaR2), an SPM derived from omega-3 fatty acid, exhibits anti-inflammatory and analgesic effects, with the ability to modulate the activity of the TRPV1 and TRPA1 ion channels of nociceptors. The objective of this study was to investigate the analgesic potential of MaR2 in a model of joint pain and neuronal activation induced by the inactivated CHIKV virus (100 FFU/10 μ L) and its recombinant envelope protein E2 (rE2) (100 ng/10 μ L) via the intra- joint (i.a.), in addition to confirming and evaluating whether the TRPA1 and/or TRPV1 channels have any relationship with the formation of hyperalgesia during infection and whether the lipid is capable of modulating this activation. CHIKVi and E2 induce mechanical and thermal hyperalgesia in Swiss mice and this state can be reduced when treated with 10 ng of MaR2, intrathecally (i.t.), demonstrating its analgesic effect. To verify how the neuronal part is involved in the formation of hyperalgesia, the calcium imaging technique was performed in vitro, with the dorsal root ganglion (DRG). It was observed that neurons stimulated with CHIKVi had a greater calcium influx when compared to Mock (the control group) and this is due to the virus's ability to modulate the activity of the TRPV1 and TRPA1 channels, presenting a much greater influx when these channels were activated. When they were pretreated with MaR2, calcium influx was reduced even in the presence of CHIKVi, TRPV1, and TRPA1 agonists. Immunofluorescence, in vivo, demonstrated a higher fluorescence intensity in DRG of animals stimulated with the inactivated virus, confirming the ability of CHIKVi to act directly on the activation of ion channels to generate hyperalgesia. This state was reversed when treated with MaR2, due to the ability of this lipid to reduce/inhibit the activation of both channels, which leads to its analgesic action. It is already known that CHIKVi and rE2 have the capacity to modulate the activity of the TRPV1 channel, but there is still no information for TRPA1. With the in vitro and in vivo results, there is a possibility that TRPA1 has its activation modulated by the virus. To confirm this, mechanical hyperalgesia was performed in animals induced with CHIKVi or rE2 and treated after one hour, i.t., with HC-030031, a selective TRPA1 antagonist. By blocking the channel, mechanical hyperalgesia was reduced, demonstrating the role of the ion channel in the formation of hyperalgesia.

Key-words: Chikungunya; Hyperalgesia; Maresin 2; TRPV1; TRPA1 channel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Mecanismo de dor.....	12
Figura 2	– Dor nociceptiva e neuropática.....	13
Figura 3	– Dor inflamatória.....	14
Figura 4	– Representação da estrutura conformacional do CHIKV.....	19
Figura 5	– Representação genética do vírus Chikungunya (CHIKV).....	20
Figura 6	– Etapas para a entrada do vírus Chikungunya	22
Figura 7	– Distribuição da Chikungunya (1975 - 2015).....	23
Figura 8	– Etapas da infecção por CHIKV.....	25
Figura 9	– Fase inicial e resolutive do processo inflamatório	28
Figura 10	– Biossíntese dos SPMs por meio do ômega-3 e ômega-6	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AITC	Isotiocianato de alila
CGRP	Peptídeos relacionado ao gene da calcitonina
CHIKV	Vírus Chikungunya
DAPI	Diamidino-2-fenilindona
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
IL	Interleucina
IFN- α	Interferon-alfa
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gama
LXA	Lipoxina A
MaR	Maresina
mRNA	RNA mensageiro
NSAID	Antiinflamatórios não esteróides
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NLRP3	Proteína 3 que contém domínio de pirina da família NLR
PD	Protectina
RvD	Resolvina da série D
RvE	Resolvina da série E
SPM	Mediadores lipídicos especializados em pró-resolução
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alpha
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Subfamília A, membro 1
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Subfamília V, membro 1
TRPM8	Receptor de Potencial Transitório Subfamília Melastatina Membro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	Dor	11
1.1.1	Canais iônicos TRP	15
1.1.1.1	TRPV1	15
1.1.1.2	TRPA1	16
1.2	Vírus CHIKV	19
1.2.1	Estrutura	19
1.2.2	Epidemiologia	23
1.2.3	Dor articular	26
1.3	Fase resolutive	28
1.3.1	Mediadores lipídicos especializados	29
2.	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3.	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (NEUROSCIENCE LETTERS)	39
5.	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	77
	ANEXO A – Cópia do Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (Nº114/2020)	77

1

2 **1. INTRODUÇÃO**

3 **1.1 Dor**

4 Fisiologicamente a dor pode ser considerada uma experiência desagradável
5 causada por um dano no tecido, alertando o corpo e indicando que algo anormal está
6 acontecendo na região periférica do nosso organismo, nos protegendo das lesões
7 causadas pelo ambiente externo (COHEN; QUINTNER; VAN RYSEWYK, 2018;
8 WOOLF, 2010).

9 Os mediadores inflamatórios como citocinas como TNF- α e IL-1 β são
10 reconhecidos pelo receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e receptor de
11 interleucina 1 (IL-1) (CUNHA *et al.*, 2005; GUDES *et al.*, 2015; PINHO-RIBEIRO; VERRI;
12 CHIU, 2017) e sensibilizam os nociceptores localizados no gânglio da raiz dorsal DRG
13 e no gânglio trigeminal (TG) (AMAYA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2023).

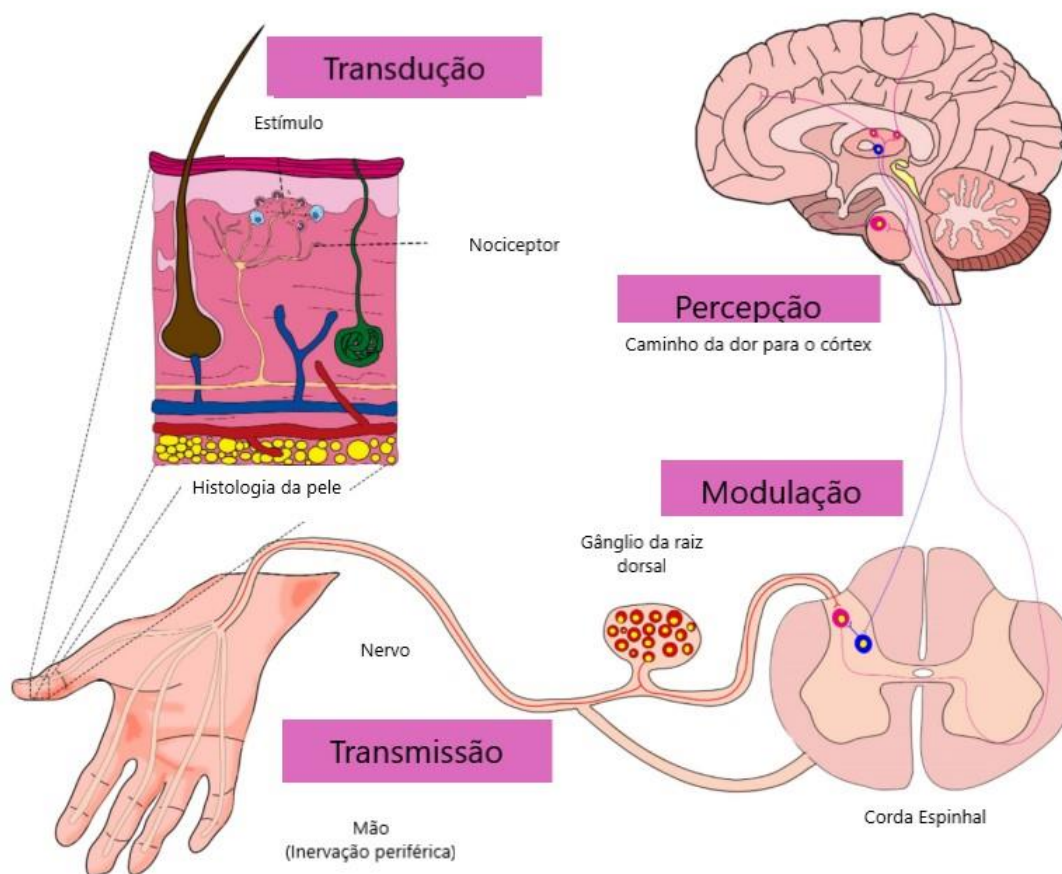
14 Os nociceptores são neurônios pseudo unipolares, com o corpo celular na região
15 periférica, responsáveis por captar estímulos nociceptivos periféricos e projetado para
16 a medula espinhal (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010) e podem ser formados por fibras C
17 não mielinizados e fibras A δ mielinizadas (MATSUDA; HUH; JI, 2019; WOOLF, 2010),
18 enervando diversas regiões do organismo como na pele, tecidos, músculos, articulações
19 e na maior parte dos órgãos viscerais (YAM *et al.*, 2018). A sensibilização do nociceptor
20 leva à modulação de canais iônicos, como canais de sódio (Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9)
21 (AMAYA *et al.*, 2000) e canal de potencial receptor transiente (TRP), que podem gerar e
22 influenciar na intensidade da percepção da sensação de dor.

23 Principais canais, iônicos são: TRPA1 (Canal de potencial transitório anquirina
24 1), sensível aos irritantes químicos; TRPV1 (Canal de potencial transitório da subfamília
25 vanilóide 1), um canal de cálcio não-seletivo sensível ao calor, e sabidamente ativado
26 pela capsaicina (componente da pimenta); e TRPM8 (Canal de potencial receptor
27 transiente da subfamília melastatina membro 8), sensível ao frio (CONSTANTIN *et al.*,
28 2008; JI *et al.*, 2011; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; ROH *et al.*, 2020;
29 SISIGNANO *et al.*, 2012).

30 A sinapse dos mediadores inflamatórios com o nociceptor primário, geram sinais,
31 que são transportando da região periférica até o corno dorsal da medula espinhal, onde
32 fazem sinapse com o neurônio de segunda ordem, gerando potenciais de ação levados
33 até o córtex somatossensorial no cérebro, onde o estímulo será traduzido em um
34 estímulo doloroso (BASBAUM *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2023).

1 A hipersensibilização dos nociceptores pode levar à hiperalgesia, uma resposta
2 exacerbada a um estímulo normalmente doloroso, ou dar origem à alodinia, uma dor
3 gerada por um estímulo que normalmente não é doloroso (VERRI *et al.*, 2006). Ainda
4 não existe um consenso de como a dor deve ser dividida. De acordo com Scholz & Woolf
5 (2002), a dor era agrupada em nociceptiva e patológica, sendo que a patológica se
6 subdividia em neuropática, inflamatória e idiopática. Porém, a classificação, utilizada
7 atualmente é a proposta pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP)
8 (2017), que agrupa a dor no tipo nociceptiva, neuropática e nociplásica ou idiopática
9 (AYDEDE; SHRIVER, 2018; COHEN; VASE; HOOTEN, 2021; COSTIGAN; SCHOLZ;
10 WOOLF, 2009; HAANPÄÄ *et al.*, 2011; SHRAIM *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2023; WOOLF;
11 MA, 2007; YAM *et al.*, 2018).

12



13

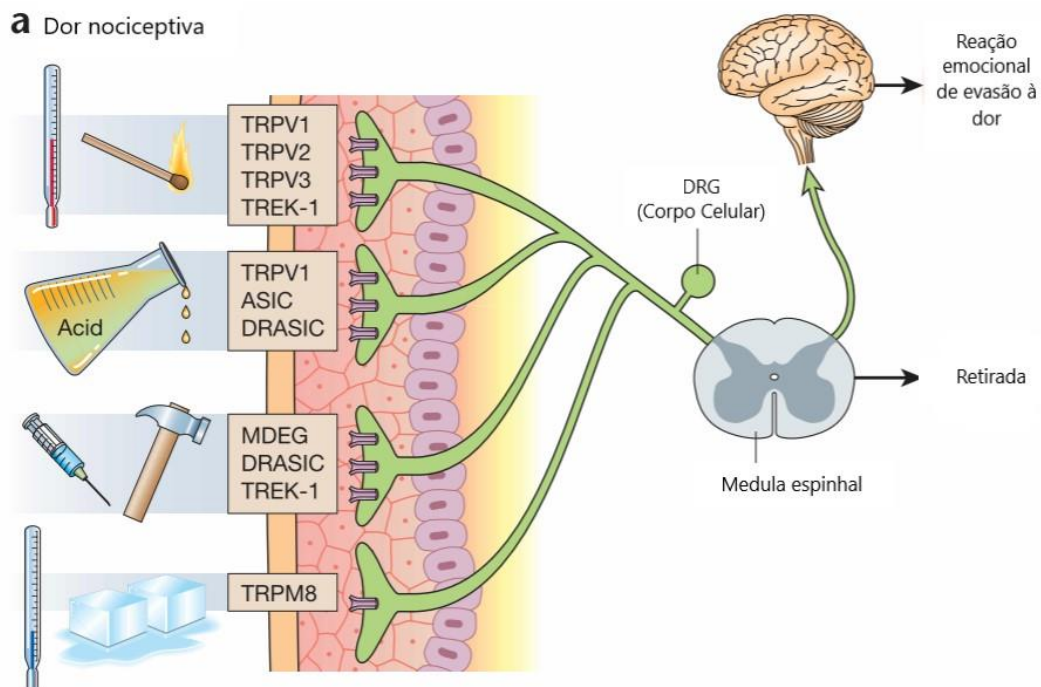
14 **Figura 1: Mecanismo de dor.** Diagrama representativo indicando os níveis envolvidos
15 na detecção do estímulo até a parte de interpretação e a modulação da dor. Os
16 estímulos são detectados por nociceptores, depois transmitidos para a corda espinhal,
17 antes de ter o potencial de ação levado até o córtex cerebral (Linha representada pela
18 cor rosa). Já o estímulo interpretado no córtex é convertido em sensação de dor e volta

1 até o local que está sofrendo a ação, passando pela medula espinhal (Representada
2 pela linha azul). Adaptada do artigo da Silva, MDV, et al., 2023.

3

4 A dor nociceptiva ou fisiológica apresenta um alto limiar de dor, e serve para proteger
5 a integridade do organismo. Pode ser categorizada em somática ou visceral (BASBAUM
6 *et al.*, 2009; SIKANDAR; DICKENSON, 2012). (Figura 2)

7 A dor neuropática surge quando o limiar de dor passa de alto para baixo pelo
8 processo de sensibilização, sendo gerada quando ocorre dano ao tecido nervoso ou
9 pela mudança nas transmissões sinápticas (BASBAUM *et al.*, 2009; FINNERUP;
10 KUNER; JENSEN, 2021). (Figura 2)



11

B Dor neuropática



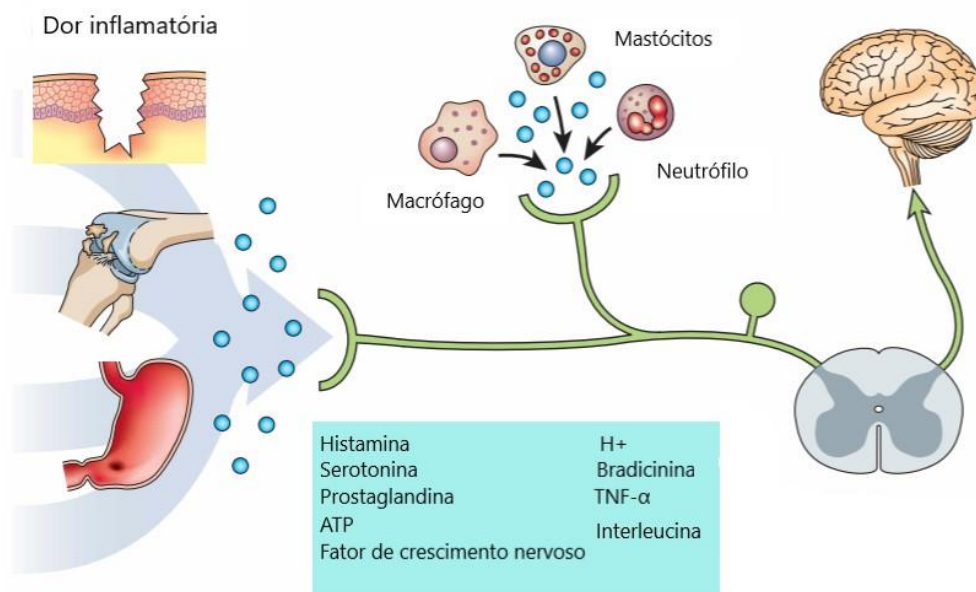
12

1 **Figura 2: Dor nociceptiva e neuropática.** (a) Dor nociceptiva surge pela modulação
2 dos nociceptores por fatores químicos ou físicos. (b) O acometimento do tecido nervoso
3 leva à formação da dor neuropática. Adaptado de Scholz & Woolf, 2002.

4

5 E por fim a dor idiopática, que ocorre pelas modulações dos nociceptores, é uma
6 condição em que há presença da dor, porém não se sabe a origem, podendo ser
7 induzida por doença ou por causa psicológica, tendo como exemplo a fibromialgia
8 (COHEN; VASE; HOOTEN, 2021; SHRAIM *et al.*, 2020; WOOLF, 2010).

9 A Chikungunya, faz parte da dor inflamatória, em que surge pela sensibilização
10 periférica dos nociceptores nos tecidos inflamados pelos mediadores inflamatórios
11 aminas vasoativas (histamina e serotonina), componentes do sistema complemento
12 (sistema de coagulação e fator ativador de plaquetas (PAF)), citocinas (fator de necrose
13 tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1)) e quimiocinas, fatores de crescimento (TGF),
14 produtos lipídicos (leucotrienos e prostaglandina) (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018; XU;
15 YAKSH, 2011), levando ao sintoma de hipersensibilidade mecânica e térmica (FATTORI
16 *et al.*, 2019). Pode ser subdividido em: dor aguda, um processo mais curto e intensa, ou
17 crônica, um processo inflamatório mais prolongado, o que gera danos ao organismo
18 (YAM *et al.*, 2018). (Figura 3)



19

20 **Figura 3: Dor inflamatória.** Os mediadores inflamatórios podem modular os neurônios
21 sensoriais, gerando potenciais de ação, transportados do corno da medula espinhal até

- 1 o córtex somatossensorial, onde a sensação de dor será gerada. Adaptado de Scholz &
- 2 Woolf, 2002.
- 3

1.1.1 Canais iônicos TRP

A superfamília dos receptores potenciais transitórios (TRP) é conhecida por sua participação na nocicepção, gerando a sensação de dor. Essa família é formada por canais iônico não-seletivos, tendo todos os integrantes, capazes de conduzir Ca^{2+} (JULIUS, 2013), com 28 membros, dividido em seis grupos: receptor transitório canonical/clássico (TRPC), vanilóide (TRPV), anquirina (TRPA), melastatina (TRPM) e mucolipínico (TRPML) (GEES *et al.*, 2012; TALAVERA *et al.*, 2020; WU; SWEET; CLAPHAM, 2010).

Os canais TRP chamam a atenção de estudiosos devido à sua versatilidade, por apresentarem múltiplas funções, em especial atuando como moléculas sensoriais para diversos estímulos (físicos, químicos, pH, substâncias pungentes, radiação e térmicos) (MOORE *et al.*, 2018).

Os principais canais envolvidos na dor são os TRPV1 e TRPA1 (BAUTISTA *et al.*, 2006), que podem ser expressos juntamente com um neurônio nociceptor (FISCHER *et al.*, 2014; KOBAYASHI *et al.*, 2005).

1.1.1.1 TRPV1

A família dos canais TRPV é formada por seis membros (TRPV1-TRPV6), todos canais não-seletivos, sendo canais permeáveis ao Ca^{2+} . Em mamíferos, o TRPV1, sensível à componente vanilóide, como a capsaicina (MOORE *et al.*, 2018).

O TRPV1, é o principal representante, sendo o mais estudado e caracterizado. É um canal sensível a diversos estímulos (temperatura, componentes endógenos e exógenos e pela alteração do pH) (MOORE *et al.*, 2018), podendo desenvolver a hiperalgesia inflamatória. É um canal capaz de modular tanto a dor, a hiperalgesia inflamatória, quanto a coceira, quando estimulado pela histamina (JULIUS, 2013; MORALES-LÁZARO *et al.*, 2016; ROMANOVSKY *et al.*, 2009; VANDEWAUW *et al.*, 2018).

São expressos preferencialmente em neurônios sensoriais do sistema periférico (PNS) de fibras C não mielinizadas e algumas de fibras A δ mielinizadas (CAVANAUGH *et al.*, 2009; DOLY *et al.*, 2004; EDWARDS, 2014; HUANG *et al.*, 2012; HWANG; MIN OH; VALTSCHANOFF, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005; PERNA *et al.*, 2021).

1 Porém, pode ser encontrado na região do sistema nervoso central (CNS)
2 e nas células do sistema imune (BERTIN *et al.*, 2014; SPICAROVA; PALECEK,
3 2008), como nas células dendríticas, macrófagos, células T e Natural Killer (NK)
4 (BERTIN *et al.*, 2014; MAJHI *et al.*, 2015; OMARI; ADAMS; GERAGHTY, 2017).

5 Durante a inflamação, os mediadores como citocina, prostaglandina e
6 bradicinina liberam sinais para aumentar a expressão e a atividade do TRPV1
7 (JULIUS, 2013; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017) e conseqüentemente,
8 essa reação em cascata leva a mudança nas propriedades do canal, facilitando
9 a sua abertura (CHENG; JI, 2008).

10 Durante o processo de sensibilização que leva à hiperalgesia, a expressão
11 contínua e elevada de TRV1 acaba mantendo a sensibilidade periférica e
12 induzindo a mudança da dor aguda para a dor crônica (AMAYA *et al.*, 2003, 2004;
13 JI *et al.*, 2002).

14 Dentre diversos os antagonistas conhecidos, o AMG-9810, é visto como
15 um potente e seletivo inibidor para o canal TRPV1, pois é capaz de bloquear a
16 despolarização e também inibir a liberação do CGRP promovida pela capsaicina
17 no gânglio da raiz dorsal de ratos, e de reverter a hiperalgesia mecânica e
18 térmica induzida no modelo murino de dor inflamatória por Adjuvante completo
19 de Freud (CFA) (GAVVA *et al.*, 2005)

20 **1.1.1.2. TRPA1**

21 TRPA1, membro da família de Receptores de Potencial Transitório (TRP) de
22 canais iônicos, é expresso nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal (DRGs) e
23 nas fibras aferentes periféricas (KWAN *et al.*, 2006). Pode ser ativado por agentes
24 eletrofílicos como isotiocianato de alila (AITC), o qual é um componente pungente
25 presente no wasabi e no óleo de mostarda, e também pode ser ativado pelos não
26 eletrofílicos como o mentol (KARASHIMA *et al.*, 2007).

27 Não é comum encontrar esse canal iônico sozinho nos neurônios
28 nociceptivos, estando geralmente (30-50%) associado aos neurônios que
29 apresentam TRPV1, apresentando uma estrutura de um canal heteromérico
30 (FISCHER *et al.*, 2014; KOBAYASHI *et al.*, 2005).

31 TRPA1 é importante para a transdução de agentes irritantes e agentes
32 endógenos para despolarizar os nociceptores, induzindo a dor inflamatória
33 (BAUTISTA *et al.*, 2006). Porém, a capacidade desse canal de estar envolvido na

1 hiperalgesia térmica (quente ou frio) ainda é algo controverso (ZHANG *et al.*,
2 2022).

3 Há diversos antagonistas para o TRPA1 sendo comercializados, porém,
4 o HC-030031, derivado da Xantina, foi o primeiro antagonista selecionado, em que
5 bloqueia o canal TRPA1 de forma reversível, independente dos agonistas, AITC
6 ou N-metil maleimide (MCNAMARA *et al.*, 2007).

7

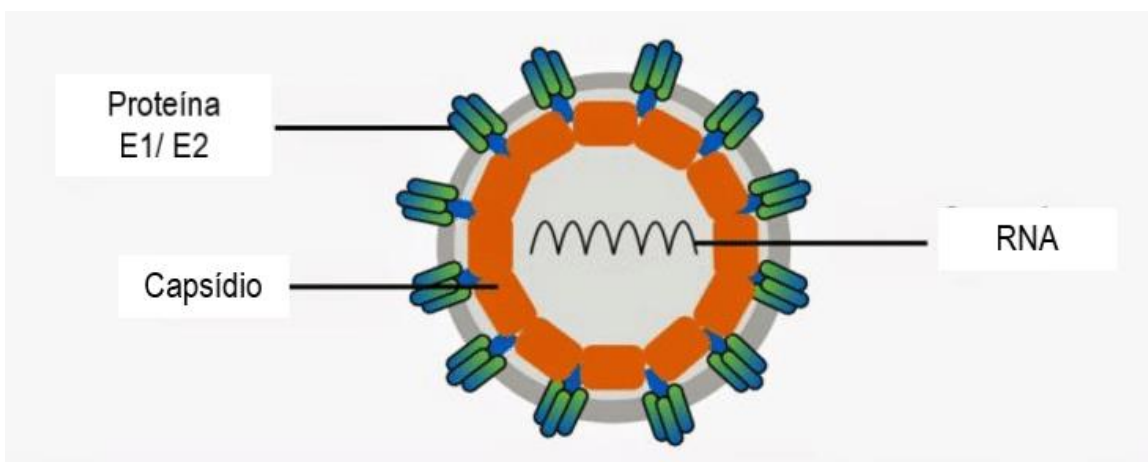
1 1.2 Chikungunya

2 1.2.1 Estrutura

3 O vírus Chikungunya (CHIKV) é o agente etiológico de uma arbovirose
4 artrogênica da família *Togaviridae*, do gênero *Alphavirus*, e faz parte de um grupo de
5 vírus com a presença de RNA envelopado (KHONGWICHIT *et al.*, 2021).

6 A palavra “Chikungunya” tem origem do dialeto Kimakonde da região sudeste da
7 Tanzânia, que significa “Aquilo que se curva” (“to become contorted”), se referindo à
8 posição curvada que os pacientes infectados desenvolvem, devido a severas dores
9 articulares (CAGLIOTI *et al.*, 2013).

10 CHIKV é um alfa vírus envelopado de estrutura esférica, com cerca de 60-70 nm
11 de diâmetro, composta por 240 cópias de proteína do capsídeo, circundado por um
12 envelope de bicamada lipídica e uma molécula de RNA de cadeia e fita simples
13 (CAGLIOTI *et al.*, 2013; CHO *et al.*, 2008; DA CUNHA; TRINTA, 2017). (Figura 4)



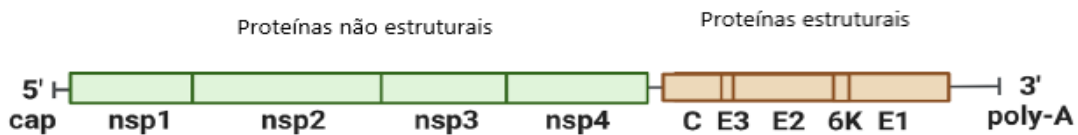
14

15 **Figura 4: Representação da estrutura conformacional do vírus Chikungunya**
16 **(CHIKV).** Mostra a estrutura esférica com três proteínas estruturais, as proteínas do
17 envelope (E1 e E2), que formam tríades de glicoproteínas, e a proteína do capsídeo
18 (C), cobrindo a superfície do vírus. Adaptado da Javaid A., et al., 2022.

19

20 Apresenta duas regiões codificantes, 5' 7-metil guanossina (ORF 5') e 3' cauda
21 poli-a (ORF 3'), separados por uma região não codificante (SILVA; DERMODY, 2017),
22 formadas por quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e três
23 proteínas estruturais (C, E1 e E2) (CAGLIOTI *et al.*, 2013). (Figura 5)

1 A região ORF 5' é responsável por codificar quatro proteínas não estruturais
2 (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) que fazem parte da RNA replicase, enquanto a ORF 3'
3 codifica seis estruturas proteicas: as proteínas do envelope 1 (E1), 2 (E2) e 3 (E3), o
4 capsídeo, proteína Transframe (TF) e a 6K (SILVA; DERMODY, 2017).



5
6 **Figura 5: Representação genética do CHIKV.** Indica a organização do genoma,
7 incluindo suas proteínas não estruturais 1 a 4 (nsP1-nsP4) e proteínas estruturais
8 (E1-E3, C, 6K/TF). Adaptado de Roongaraya P, et al., 2023.

9
10 A proteína E1 é conhecida por permitir a fusão das membranas (DA CUNHA;
11 TRINTA, 2017; VOSS *et al.*, 2010) e a E3 tem função de se translocar para o retículo
12 endoplasmático e de auxiliar na montagem e liberação de partículas virais para a
13 parte externa da célula (TANABE *et al.*, 2018).

14 Já a E2, a parte estrutural vista como a mais importante, é o alvo das respostas
15 dos anticorpos, por apresentar o epítipo E2EP3, conseguindo ativar linfócitos T
16 CD4+ e assim levando a produção de IFN-gama, resultando na formação de edemas
17 e inflamação nas articulações (FOX *et al.*, 2015; HOARAU *et al.*, 2010; SUN *et al.*,
18 2013).

19 O vírus CHIKV tem a capacidade de se replicar em diversas células de
20 vertebrados e invertebrados (SOURISSEAU *et al.*, 2007), pois podem realizar
21 mutações, o que facilita a invasão do vírus nos hospedeiros.

22 Isso só é possível devido às glicoproteínas E1 e E2, sendo a proteína E2 a mais
23 importante. Elas são capazes de modificar as estruturas do Chikungunya, carregar a
24 maioria do epítipo da carga viral e participar da ligação e entrada do vírus em células
25 de interesse (AGARWAL *et al.*, 2016; DA CUNHA; TRINTA, 2017; SINGH *et al.*, 2018;
26 VOSS *et al.*, 2010), levando assim à infecção.

27 CHIKV e outros alfavírus artritogênicos, utilizando receptor de membrana, Mxra8
28 (Remodelação da matriz associada 8), conseguem entrar e infectar o hospedeiro ao
29 ligar a estrutura de proteína com esse receptor (BASORE *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*,
30 2018).

1 Mxra8, conhecido também como DICAM, ASP3 ou limitrina, é uma molécula
2 conservada, que não interfere na transcrição e nem na replicação do vírus (ZHANG
3 *et al.*, 2018). É encontrada em mamíferos, aves, répteis e peixes (ZIMMERMAN *et*
4 *al.*, 2023), sendo expresso em células epiteliais, mieloides e mesenquimais (HAN *et*
5 *al.*, 2013; JUNG *et al.*, 2008, 2012), e considerado como homóloga a molécula de
6 junções aderentes (JUNG *et al.*, 2008).

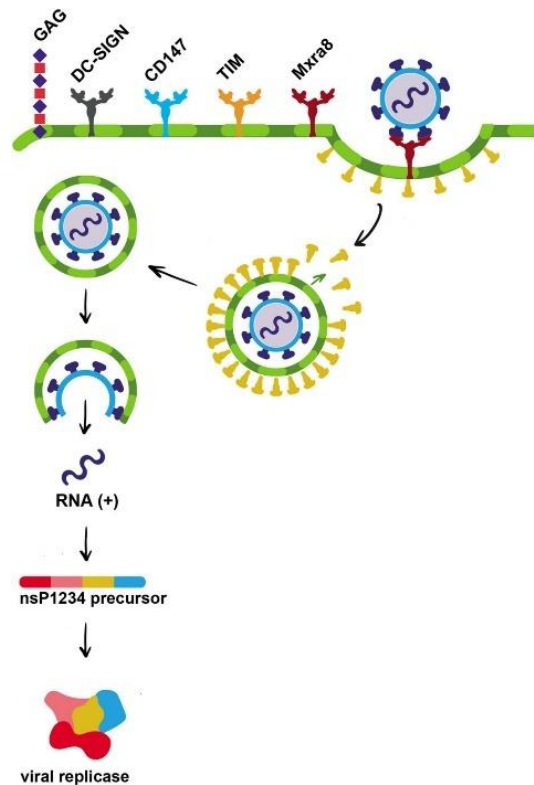
7 A expressão do receptor Mxra8 é vista como necessária para ocorrer a infecção
8 nos fibroblastos, células do músculo esquelético e condrócitos de células humanas
9 (BASORE *et al.*, 2019).

10 Porém, em certas situações, pode ocorrer a entrada do vírus mesmo na ausência
11 do Mxra8 e de um mosquito com ancestralidade em comum, indicando que pode
12 haver fatores adicionais que contribuem para isso, porém ainda não foram totalmente
13 identificados (ZHANG *et al.*, 2018).

14 A entrada do CHIKV no hospedeiro depende da proteína recombinante E2 (rE2).
15 O rE2 se liga ao receptor de membrana Mxra8 (BASORE *et al.*, 2019; SONG *et al.*,
16 2019; ZHANG *et al.*, 2018) e essa ligação acaba ativando a via de sinalização
17 mediada pela clatrina, levando à endocitose do vírus, criando um endossomo (LEE
18 *et al.*, 2013). O pH do meio acaba se tornando ácido, e essa acidificação faz com que
19 dissocie as moléculas de clatrina, modificando as proteínas do envelope viral, o que
20 permite a fusão da membrana viral com a membrana endossomal do hospedeiro
21 (LEE *et al.*, 2013). (Figura 6).

22 Após esse processo, o nucleocapsídeo do vírus é liberado no citoplasma e o RNA
23 viral começa a fazer ao processo da tradução das quatro proteínas do complexo de
24 replicação viral (nsP1-nsP4) e das proteínas estruturais como o capsídeo, pE2
25 (precursor de E2 e E3), E1 e 6K, que serão utilizados para dar origem a novas
26 partículas virais (CONSTANT *et al.*, 2021).

27 As proteínas precursoras do envelope são transportadas para o complexo de
28 Golgi e para o retículo endoplasmático, para formar o heterodímero E1-E2 (YAP *et*
29 *al.*, 2017). Depois, serão levadas até a membrana da célula hospedeira, onde o vírus
30 é liberado novamente para poder encontrar uma nova célula alvo e assim dar
31 continuidade à replicação viral (CONSTANT *et al.*, 2021).



1

2 **Figura 6: Etapas para a entrada do vírus Chikungunya.** Os alfas vírus utilizam da
 3 estrutura de proteína para se ligar ao receptor de membrana Mxra8, para entrar no
 4 hospedeiro. Essa ligação promove uma endocitose do vírus, levando à modificação
 5 do envelope viral, permitindo a fusão da membrana do vírus com a do hospedeiro.
 6 Esse processo permite a liberação do nucleosídeo para o citoplasma, e com isso o
 7 RNA inicia o processo da tradução, para criar novas partículas virais. Adaptado da
 8 Constant L.E.C. *et al.* (2021).

9

10 Durante a infecção pelo vírus CHIKV, inicia-se uma resposta imune mediada por
 11 macrófagos (MØ), neutrófilos, células dendríticas, células natural killer (NK),
 12 eosinófilos e basófilos (CHIRATHAWORN; CHANSAENROJ; POOVORAWAN,
 13 2020). Tendo uma maior atuação de interferons (IFN - α , - β e - γ), das as interleucinas
 14 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6), do ligante 10 de quimiocina relacionada a C-X-C (CXCL10 ou
 15 IP10), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de
 16 granulócitos (G-CSF) e da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1/ CCL2),
 17 como descrito em outros trabalhos na literatura (CHIRATHAWORN;
 18 CHANSAENROJ; POOVORAWAN, 2020; TANABE *et al.*, 2018)

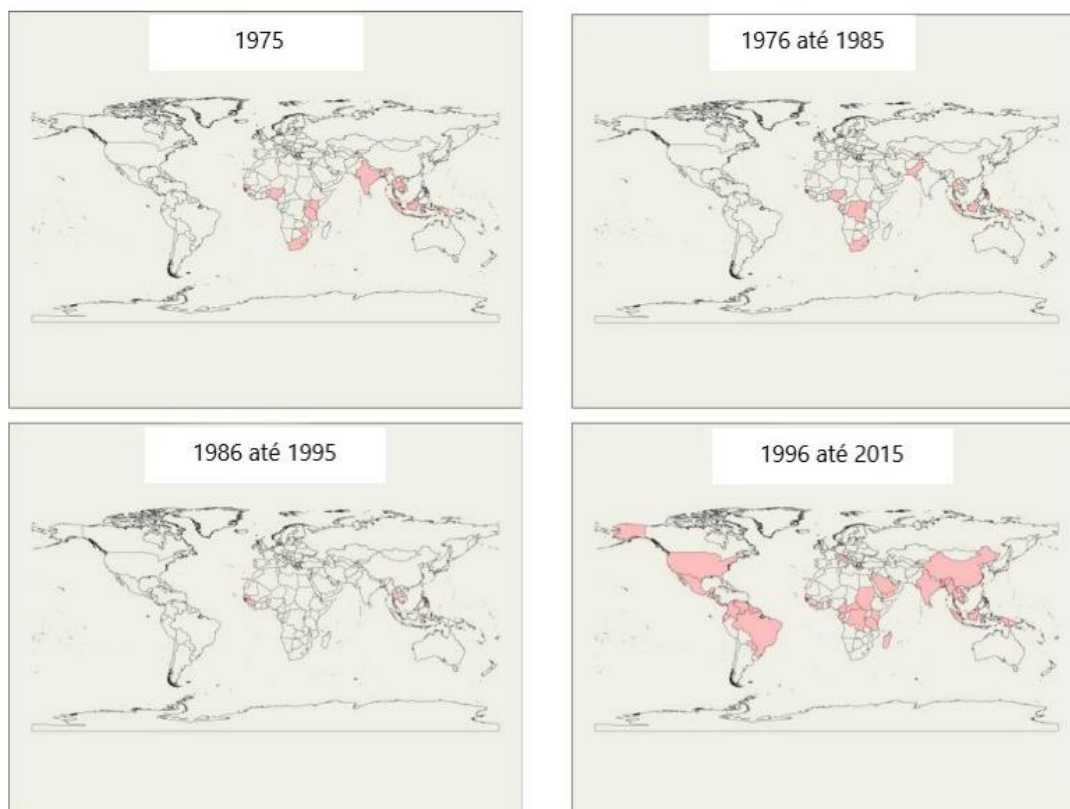
19

1 1.2.2 Epidemiologia

2 Cerca de 30 espécies de arbovírus são incluídas no gênero alphavirus, sendo
3 vírus amplamente distribuídos ao redor do mundo, com exceção da Antártica
4 (CAGLIOTI *et al.*, 2013). A mudança na quantidade de hospedeiros, os fatores
5 sociais, demográficos e ecológicos, influenciam na diversidade genética de
6 Alphavirus (OLIVIA *et al.*, 2015), que acaba dificultando a sua prevenção.

7 O CHIKV tem uma rápida disseminação, e quando mantidos em condições
8 apropriadas, podem levar a efeitos citopáticos de 1 a 3 dias após a infecção, diferente
9 de outros arbovírus (OLIVIA *et al.*, 2015). É um dos responsáveis pela severa e
10 debilitante doença articular na população mundial, impactando a economia mundial
11 (SONG *et al.*, 2019). Embora seja uma doença amplamente estudada, o
12 conhecimento sobre a imunopatogênese do vírus ainda é limitado (TANABE *et al.*,
13 2018).

14 O primeiro caso envolvendo CHIKV foi em meados de 1952-53 na Tanzânia,
15 enquanto os primeiros casos urbanos foram registrados na Tailândia e na Índia em
16 meados de 1970. Desde então, vários casos vêm sendo contabilizados ao redor do
17 mundo (Figura 7).



18

1 **Figura 7: Distribuição da Chikungunya (1975 até 2015).** O primeiro caso relatado
2 foi na Tanzânia (1952-53). Foram registrados casos na Tailândia e na Índia em
3 meados de 1970 e depois disso disseminou-se no mundo todo. No Brasil, foi em 2014
4 que o vírus foi relatado, sendo que envolvendo humano ocorreu em 2015. Adaptado
5 do Lwande O.W. *et al.*, 2015.

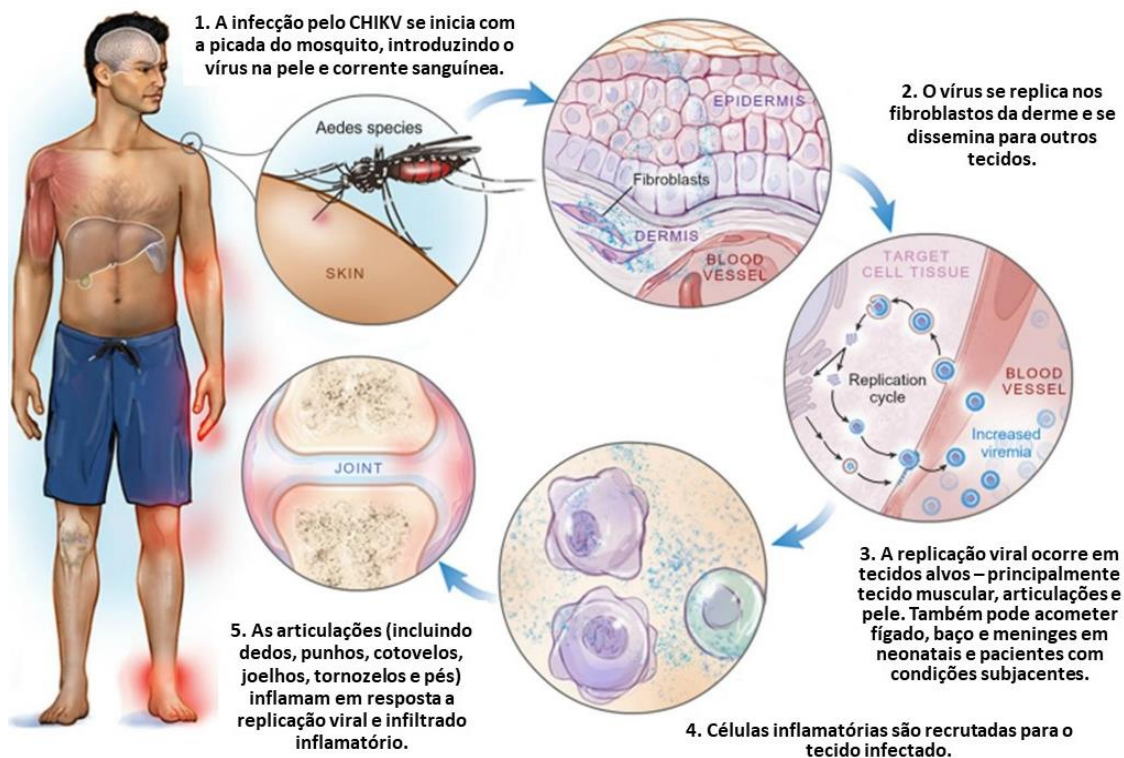
6
7 O primeiro caso do CHIKV no Brasil foi no estado do Amapá–AP, em 2014. Até
8 o momento, 256.927 casos prováveis de Chikungunya foram registrados no país,
9 segundo o boletim epidemiológico (2023), o que demonstra sua importância,
10 caracterizando um grande problema de Saúde Pública que reflete na economia do
11 país.

12 Nos últimos anos, a doença causada pelo CHIKV emergiu novamente, gerando
13 alarde ao nível de Saúde Pública Mundial (DAVID *et al.*, 2017). Até o mês de
14 dezembro do ano de 2023, 500.000 casos e 400 mortes por CHIKV, ao redor do
15 mundo (European Centre for Disease Prevention and Control – ecdc, 2023). A
16 Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) de 2023 notificou um total de
17 3.110.442 casos de arboviroses, incluindo dengue, chikungunya e Zika vírus, sendo
18 271.006 casos de chikungunya (OPAS/OMS, 2023).

19 Chikungunya tem um ciclo de transmissão enzoótico/silvático e um ciclo urbano,
20 em que infectam animais e humanos, servindo como reservatório do vírus para
21 quando forem ativos novamente, permitirem um desenvolvimento e disseminação de
22 forma mais amplificada (ALTHOUSE *et al.*, 2018; TSETSARKIN; CHEN; WEAVER,
23 2016). Em ambientes florestais, ocorre pela picada de vários mosquitos fêmeas do
24 gênero *Aedes*, já em ambiente urbano a transmissão acontece por duas espécies,
25 *Aedes aegypti* e/ou *albopictus*, sendo eles os principais vetores de transmissão.

26 Após a picada do mosquito, o vírus vai para a pele e sistema sanguíneo, onde
27 ocorrem as primeiras replicações nos fibroblastos da derme e nos macrófagos, para
28 depois se dispersar pela corrente sanguínea para outras regiões do corpo como o
29 fígado, músculos, articulações, baço, nódulos linfáticos e até o cérebro (DA CUNHA;
30 TRINTA, 2017; SILVA; DERMODY, 2017). (Figura 6).

31
32
33



1

2 **Figure 8: Etapas da infecção por CHIKV.** O mosquito *Aedes* pica o hospedeiro e, com
 3 isso, o vírus é inoculado na pele e corrente sanguínea. No fibroblasto da derme e nos
 4 macrófagos, ocorrem as primeiras replicações virais. Após isso, os vírus replicados são
 5 transportados para outros órgãos como baço, fígado, músculo, articulações, vasos
 6 linfáticos e até no cérebro. Adaptado de Couderc & Lecuit, 2015.

7

8 Em humanos, o vírus causa, uma doença febril, denominada de febre
 9 Chikungunya, que resulta em sintomas como febre alta, irritação e erupções na pele,
 10 dores nas juntas, mialgia (dor muscular), dores de cabeça, vômitos, náuseas e
 11 artralgia, que é uma dor exacerbada nas articulações (BURT *et al.*, 2017; DA CUNHA;
 12 TRINTA, 2017). São sintomas que podem durar algumas semanas e depois
 13 desaparecer, pois o próprio sistema imune do paciente consegue combater o vírus.

14 Porém, em alguns pacientes, podem se desenvolver na doença crônica,
 15 afetando principalmente as articulações, dificultando as atividades do dia a dia (DA
 16 CUNHA; TRINTA, 2017; JAVELLE *et al.*, 2015; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

17 Em camundongos, a infecção por CHIKV apresenta dois picos de ação. O
 18 primeiro pico, entre 2-3 dias após a infecção, ocorre a replicação viral levando a morte
 19 celular, produção de citocinas e a formação de edema no local da inoculação, já no

1 segundo pico, entre 6-7 dias, a infecção sai da corrente sanguínea e passa a ocorrer
2 nos tecidos, associada ao aumento de células inflamatórias nas articulações,
3 gerando mais edema, sinovites e miosites (CAGLIOTI *et al.*, 2013; FOX; DIAMOND,
4 2016; GARDNER *et al.*, 2010).

5 6 **1.2.3 Dor articular**

7 A formação da artrite grave não é algo específico do CHIKV, podendo ser
8 desenvolvida por outros vírus do gênero Alphavirus como Mayaro, Sinbis, Ross River
9 e O'nyong Nyontambém podem (MARKS; MARKS, 2016; OLIVIA *et al.*, 2015;
10 VASSILOPOULOS; CALABRESE, 2008).

11 É uma fase que afeta em torno de 40-59% dos pacientes, gerando implicações
12 econômicas e sociais, por impactar a qualidade de vida dos pacientes infectados,
13 devido à perda da morbidade e da produtividade econômica (MARIMOUTOU *et al.*,
14 2015; MOREIRA *et al.*, 2023). Os pacientes apresentam inchaço, mialgia, distúrbios
15 cognitivos e principalmente a artrite crônica de Chikungunya (ACC), que afetam
16 regiões do punho e tornozelo, podendo levar a bursite e tendinite, que tem como
17 sintomas durante esse período (AMARAL; BILSBORROW; SCHOEN, 2020;
18 BENJAMANUKUL *et al.*, 2021; BORGHERINI *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ-MORALES
19 *et al.*, 2016).

20 A duração da artrite crônica varia de dias a meses, às vezes até anos, sendo que
21 isso pode variar para cada paciente, pois a artrite pode originar durante a fase aguda
22 e se tornar algo permanente, ou ocorrer a fase inicial e depois se tornar crônico
23 (KENNEDY AMARAL PEREIRA; SCHOEN, 2017).

24 O surgimento da dor e inflamação nas articulações pode estar relacionada a
25 liberação de citocinas e quimiocinas pelos macrófagos e também pela mudança no
26 perfil de citocinas liberadas durante a fase aguda, como IL-1, IL-6 e TNF- α
27 (COUDERC *et al.*, 2008; KENNEDY AMARAL PEREIRA; SCHOEN, 2017; ROJAS *et*
28 *al.*, 2018), já demonstrado em modelos de camundongos, com infiltração de
29 monócitos, macrófagos e linfócitos (GARDNER *et al.*, 2010; GOUPIL *et al.*, 2016;
30 MORRISON *et al.*, 2011) em articulações inflamadas com efeitos significativos nos
31 fibroblastos residentes (COUDERC *et al.*, 2008).

32 A patogênese da artrite crônica de CHIKV, pelas hipóteses levantadas, ocorre
33 devido à persistência do RNA viral no líquido sinovial, uma persistência na replicação.

1 viral nas articulações e a indução da autoimunidade pelo vírus levarão à disfunção
2 das células T e B, resultando em autoimunidade (HOARAU *et al.*, 2010; OZDEN *et*
3 *al.*, 2007; PERL, 1999; ZAID *et al.*, 2018).

4 A ACC, geralmente, é denominada de “Reumatismo inflamatório crônico pós-
5 Chikungunya”, sendo colocado no mesmo grupo da artrite reumatoide (AR) por imitar
6 clinicamente e por atender aos critérios de diagnóstico do American College of
7 Rheumatology (ACR) de 2010 (AMARAL; BILSBORROW; SCHOEN, 2020;
8 AMARAL; BINGHAM; SCHOEN, 2020; BOUQUILLARD; COMBE, 2009; JAVELLE *et*
9 *al.*, 2015; RODRÍGUEZ-MORALES *et al.*, 2016; SCHILTE *et al.*, 2013; ZAID *et al.*,
10 2018). Além disso, ACC afeta mais mulheres de meia-idade, apresentam elevados
11 marcadores inflamatórios (Fator reumatoide Imunoglobulina M (FR-IgM) e anticorpo
12 anti peptídeo citrulinado cíclico (Anti-CCP), tem padrão e simetria de
13 desenvolvimento articular, e uma resposta positiva a corticosteroides e anti-reumática
14 modificadora de doença (DMARSs), se assemelhando ao AR (AMARAL *et al.*, 2023;
15 KENNEDY AMARAL PEREIRA; SCHOEN, 2017; RODRÍGUEZ-MORALES *et al.*,
16 2016).

17 Como nenhum tratamento antiviral específico demonstrou ser eficaz contra a
18 artrite crônica por CHIKV (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2016; SUTARIA;
19 AMARAL; SCHOEN, 2018), acabam sendo recomendados tratamentos para a artrite
20 reumatoide, em que acabam sendo eficazes por ACC ter semelhança patogênica
21 com a AR (AMARAL; BINGHAM; SCHOEN, 2020; AMARAL; SUTARIA; SCHOEN,
22 2018; JAVELLE *et al.*, 2015).

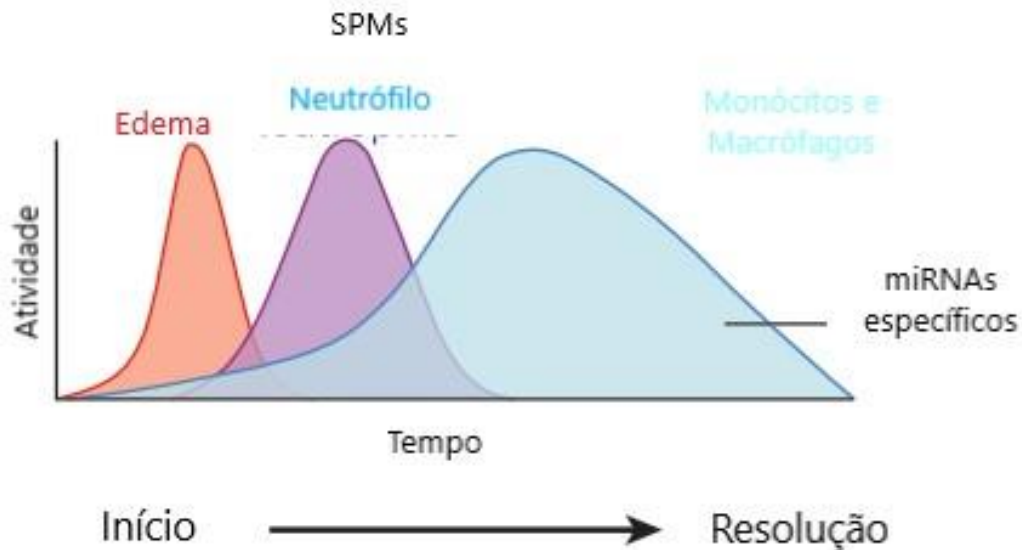
23 São recomendados como opções de tratamento, anti-inflamatórios não
24 esteroides (Aines), corticosteroides, hidroxicloroquina (HCQ), sulfassalazina (SSZ),
25 leflunomida, metotrexato (MTX), analgésicos comuns como opioides,
26 anticonvulsivantes, antidepressivos e até fisioterapia (JAVELLE *et al.*, 2015; SIMON
27 *et al.*, 2015), mostrando ser eficazes para o tratamento da dor articular por CHIKV.

28 Porém, o uso a longo prazo pode gerar efeito adverso ao paciente, sendo algo
29 desvantajoso. Com isso, novos tratamentos alternativos estão sendo procurados. E
30 uma das formas é por meio da utilização do produto da fase resolutive, os mediadores
31 lipídicos especializados pró-resolução (SPMs).

32

1 1.3 Fase resolutive do processo inflamatório

2 O processo inflamatório é uma resposta adaptativa do organismo, servindo como
3 uma defesa essencial para permitir a sobrevivência do indivíduo. A inflamação pode
4 ser regulada por duas classes de mediadores, pró-inflamatória e anti-inflamatória
5 (Figura 9).



6
7 **Figura 9: Fase Inicial e resolutive do processo inflamatório.** O reconhecimento da
8 lesão ou agente infeccioso induz o processo inflamatório. Isso gera uma cascata de
9 sinalização para a liberação de mediadores inflamatórios. Adaptado do Serhan, 2014.

10
11 A inflamação inicia quando padrões moleculares associados a patógenos
12 (PAMPs), padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que surgem do próprio
13 organismo (FILHO, 2018) ou alarminas, são reconhecidos pelos receptores de
14 reconhecimento do padrão (PRRs). PRRs podem ser receptor do tipo toll (TLRs)
15 presente nos endossomos, tipo NOD (receptores similares ao domínio de
16 oligomerização ligante de nucleotídeo) (NLR) presente no citosol de macrófagos e
17 mastócitos, e do tipo RIG-1 (RLRs) (BIANCHI, 2007; JANEWAY; MEDZHITOV, 1998;
18 MATZINGER, 2002; MEDZHITOV, 2008; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

19 Esse reconhecimento leva a ativação dos fatores de transcrição como o fator
20 nuclear (NF- κ B), induzindo a produção e liberação de mediadores inflamatórios
21 (quimiocinas e citocinas) levando a sinalização e consequentemente estimulam células
22 imunes residentes a dar início a fase inicial da inflamação (CHIU; VON HEHN; WOOLF,

1 2012; GHASEMLOU *et al.*, 2015; LUOSTARINEN; HÄMÄLÄINEN; MOILANEN, 2021;
2 SERHAN; CHIANG, 2008; TAN *et al.*, 2022; WOOLF, 2010; ZHANG *et al.*, 2022).

3 Na fase inicial, são formadas pelos mediadores lipídicos pró-inflamatórios, como
4 as aminas vasoativas (histamina e serotonina), componentes do sistema complemento
5 (sistema de coagulação e fator ativador de plaquetas (PAF)), citocinas (fator de
6 necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1)) e quimiocinas (Interleucina-1 beta (IL-
7 1 β), proteína quimiotática de monócito 1 (CCL2), Quimiocina CXC ligante 5 (CXCL5)),
8 fatores de crescimento (TGF), produtos lipídicos (leucotrienos e prostaglandina) e
9 produtos da ativação do complemento (CHEN *et al.*, 2018).

10 A liberação dos mediadores inflamatórios leva a vasodilatação da região próxima
11 do foco inflamatório para melhorar o fluxo sanguíneo, levando a uma maior
12 permeabilidade vascular e uma melhor quimiotaxia, contribuindo para a formação do
13 edema e também permite que os leucócitos, como os neutrófilos e os
14 monócitos/macrófagos, consigam se concentrar mais nas áreas marginais e assim
15 entrando na fase resolutiva, para trazer o organismo a homeostase (ABBAS;
16 LICHTMAN; PILLAI, 2014).

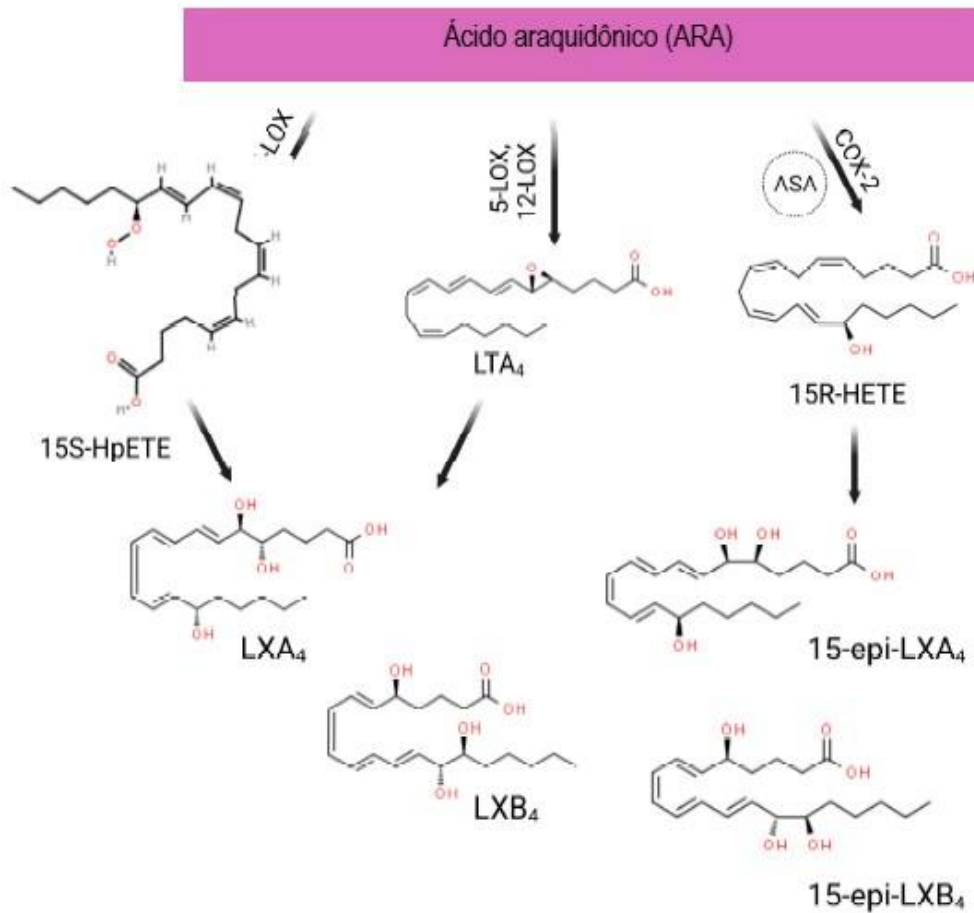
17 O processo resolutivo, quando sofre falhas ou erros, pode desencadear
18 inflamações exacerbadas que levam à destruição de tecidos e até desenvolver o 5º
19 sinal cardinal, o qual é a perda da função do tecido e/ou órgão.

20 **1.3.1 Mediadores lipídicos especializados pró-resolução (SPMs)**

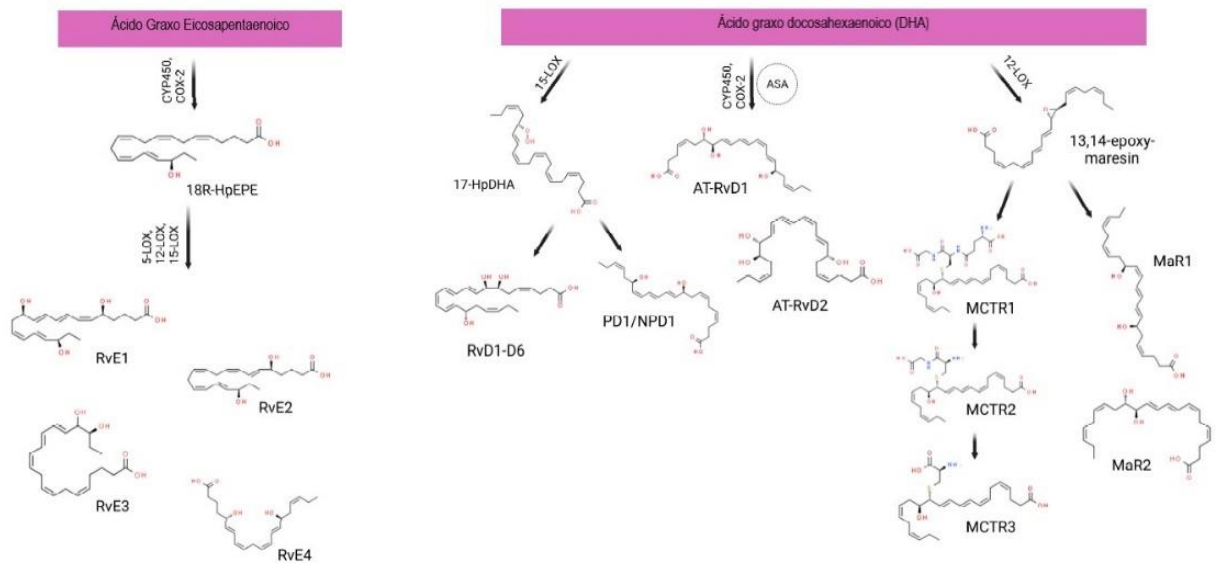
21 Os mediadores lipídicos especializados pró-resolução (SPMs) são sintetizados
22 por componentes inflamatórios, como leucócitos, induzindo a apoptose dos
23 neutrófilos, infiltração dos macrófagos, polarização do macrófago tipo M2 e a
24 eferocitose, para estimular a fase resolutiva, e assim trazer a homeostase
25 (MÜLLER-LADNER *et al.*, 2005; RASQUEL-OLIVEIRA *et al.*, 2023).

26 Os SPMs podem originar dos ácidos graxos essenciais do ômega-6, que gera
27 o ácido araquidônico (ARA), e do ômega-3, que pela ação da enzima 15-
28 lipoxigenase, induzidas pela sinalização da PGE₂ nos neutrófilos dá origem ao
29 ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) e o ácido graxo docosahexaenóico
30 (DHA)(SERHAN, 2010, 2014). Origina a família lipoxina (LX) a partir do ARA,
31 resolvinas da série E (RvE1, RvE2 e RvE3), pelo EPA e série D (RvD1, RvD2,
32 RvD3, RvD4, RvD5 e RvD6), juntamente com as neuroprotectinas (NPD1/ PD1) e
33 as maresinas (MaR1 e MaR2) do DHA (LEVY *et al.*, 2001; SERHAN, 2010, 2014;
34 SERHAN; CHIANG, 2008; SERHAN; PETASIS, 2011).

1 O uso dos SPMs vem sendo estudado por apresentarem características
 2 farmacológicas relacionadas à prevenção de doenças, pelas ações anti-
 3 inflamatórias, pró-resolutivas e analgésicas (FATTORI *et al.*, 2019; SERHAN, 2010,
 4 2014; XU *et al.*, 2010), levando a diminuição no recrutamento de neutrófilos para o
 5 local de inflamação e limpeza das superfícies endoteliais, além da inibição na
 6 produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias
 7 (CALDER, 2006; FATTORI *et al.*, 2019; HONG *et al.*, 2003; LARSSON *et al.*, 2004;
 8 SERHAN, 2010, 2014).



9



1

2 **Figura 10: Biossíntese das SPMs por ômega-3 e ômega-6.** Os mediadores
 3 lipídicos especializados pró-resolução derivam da transformação dos ácidos graxos
 4 essenciais do ômega-6, que gera o ácido araquidônico (ARA), e o ômega-3, que
 5 forma o ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) e ácido graxo docosahexaenóico
 6 (DHA). Adaptado da Rasquel-Oliveira F.S., *et al.*, 2023.

7

8 A família das maresinas, formada por Maresina 1 (MaR1) e Maresina 2 (MaR2),
 9 foram descobertos inicialmente na peritonite de camundongos e em macrófagos
 10 humanos (SERHAN *et al.*, 2009). São lipídios derivados do DHA e produzidos por
 11 macrófagos, com ações anti-inflamatórias e analgésicas, sendo isso comprovado por
 12 diversos estudos com diferentes modelos de dor e inflamação na literatura.

13 A MaR1 foi inicialmente identificada em fluidos sinoviais humanos de pacientes
 14 com artrites (GIERA *et al.*, 2012). É um lipídio com ações pró-resolutivas, anti-
 15 inflamatórias, anti-nociceptivas e capacidade de regenerar tecidos (CHIANG *et al.*,
 16 2012; SERHAN *et al.*, 2009). Além disso, é capaz de reduzir resposta pró-inflamatória
 17 nas células epiteliais dos brônquios provocada pela poeira (NORDGREN *et al.*, 2013),
 18 tem capacidade de fazer as células mesenquimais funcionarem e de curar lesão
 19 provocada por diabetes e isquemia renal (TIAN *et al.*, 2011, 2012).

20 Já a MaR2 foi adicionada posteriormente (DENG *et al.*, 2014), funcionando
 21 para tratamento de dores inflamatórias e neuropáticas, no modelo de dor orofacial,
 22 com uma potente e duradoura ação analgésica, prevenindo o desenvolvimento do
 23 calor facial e a hiperalgesia mecânica, e levando a inibição dos neurônios CRGR+
 24 nos gânglios trigeminiais (TG) (LOPES *et al.*, 2023).

1 Também demonstrou ação anti-inflamatória no modelo de dor induzida por LPS,
2 levando à diminuição do recrutamento de neutrófilos e monócitos para as patas dos
3 camundongos (FATTORI *et al.*, 2022). Reduziu a inflamação crônica no modelo de
4 obesidade, por agir sobre os macrófagos do fígado e também por ativar os tecidos
5 adipócitos marrons (SUGIMOTO *et al.*, 2022).

6 Deng et al. (2014) e Fattori et al. (2022) mostraram que a MaR2, em modelo de
7 peritonite induzido por Zymosan, conseguiu reduzir o recrutamento de neutrófilos
8 CD11b⁺ Ly6G⁺ para a cavidade peritoneal e induzir a fagocitose das partículas de
9 zymosan pelos macrófagos humanos *in vitro*.

10 Miranda et al. (2022) apresentaram evidências de que a inflamação crônica no
11 intestino induzida pelas feridas na mucosa do cólon *in vivo*, quando tratada com
12 MaR2, induzia a migração das células epiteliais do intestino para reparar a lesão na
13 mucosa do cólon (MIRANDA *et al.*, 2023).

14 No modelo de asma, a MaR2, minimiza a inflamação alérgica das vias
15 respiratórias induzida pela Ovalbumina, diminuindo o número de células inflamatórias
16 na lavagem de fluido bronco alveolar, além de reduzir a expressão do mielo
17 peroxidase (MPO), Ly-6G, ICAM-1, NLRP3 e a enzima Caspase-1 no tecido pulmonar,
18 inibindo o estresse oxidativo em camundongos (YU *et al.*, 2022).

19 Essas informações demonstram as amplas e positivas ações da Maresina 2 em
20 diferentes modelos de doenças, indicando suas propriedades promissoras como
21 alternativa de tratamento.

22

1 **2. OBJETIVOS**

2

3 **2.2 Objetivo Geral**

4 Investigar a atividade e os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos da
5 Maresina 2 em modelo de dor aguda provocada pela infecção por vírus Chikungunya
6 inativado e a sua proteína recombinante E2.

7

8 **2.3 Objetivos Específicos**

- 9 • Avaliar o efeito da MaR2 na hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pelo vírus
10 Chikungunya inativado e a sua proteína recombinante E2;
- 11 • Avaliar o efeito do antagonista do canal iônico TRPA1, HC-030031 na
12 hiperalgesia mecânica induzida pelo vírus Chikungunya inativado e a sua proteína
13 recombinante E2;
- 14 • Avaliar o efeito da MaR2 na ativação de neurônios do gânglio da raiz dorsal por
15 imageamento de cálcio e imunofluorescência estimulados pelo vírus
16 Chikungunya inativado;

17

18

19

20

21

22

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.2 Animais

Os camundongos Swiss machos (25-30g, 8 semanas) foram obtidos do Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para realização dos experimentos. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno padrão que medem 41 x 34 x 16 CM (máximo de 12 animais por caixa), tendo livre acesso à água e ração (comercial própria para a espécie de roedores) e condições de temperatura (22 °C), ciclo claro/escuro (12/12 h) e exaustão do ar controladas.

Para todos os experimentos, foram usados 12 animais no total, sendo 6 animais no primeiro experimento e outros 6 animais para a repetição. Todos os experimentos realizados foram avaliados e autorizados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA N° 114/2020). Todos os procedimentos de cuidado e manuseio estão conforme as diretrizes da Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP).

3.3 Protocolos experimentais

Tendo como referência o protocolo experimental do Segato-Vendrameto, *et al.* (2023), foram utilizados Mock (10µL) ou salina (10µL), vírus Chikungunya inativado (CHIKVi) (100 FFU, 10 uL) ou com a proteína recombinante E2 (rE2) (100 ng/ 10µL), para estimular os animais pela via intra-articular (i.a.). Depois de 1 hora, os animais foram tratados com 1, 3 e 10 ng de MaR2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) ou veículo de forma intratecal (i.t.), sendo posteriormente medidos a hiperalgesia mecânica e térmica.

Para o imageamento de cálcio, foram utilizados os gânglios da raiz dorsal (DRGs) de camundongos naives, coletados da região L1-S5 da medula espinhal, para depois serem induzidos e/ou tratados após processadas e plaqueadas.

Já para imunofluorescência, os animais foram induzidos *in vivo*, e depois, na sétima hora, DRGs foram coletados, da região L2-L6 e processados seguindo o protocolo do laboratório.

E para finalizar, foi realizada a hiperalgesia mecânica com o HC-030031 (Sigma-Aldrich), antagonista do canal TRPA1, em duas etapas, com as doses 10 µg, 30 µg e

1 50 µg e 0,1 µg, 1 µg e 10 µg, administrada via i.t. 1 hora após a indução com CHIKVi
2 ou rE2.

3.4 Vírus Chikungunya Inativado (CHIKVi)

3
4
5 O vírus utilizado neste experimento (CHIKV BR_2015/15010) foi isolado do soro
6 de um paciente com doença de chikungunya do Nordeste do Brasil no ano de 2015. O
7 vírus foi amplificado, titulado pelo ensaio de formação de focos em células C6/36 e
8 inativado usando β- propiolactona (0,025%, 72h, 4°C). O vírus inativado foi
9 concentrado por precipitação com PEG 7%/NaCl 2,3% e purificado usando almofada
10 de sacarose.

11 Um controle não infectado (Mock) foi preparado do mesmo modo a partir do
12 sobrenadante da cultura de células C6/36 inativadas com β-propiolactona, como já
13 descrito (SEGATO-VENDRAMETO *et al.*, 2023).

3.5 Proteína Recombinante E2 (rE2)

14
15
16 A proteína E2 recombinante do CHIKV (rE2) foi expressa por células S2 de
17 *Drosophila*. Células S2 foram co-transfectadas com os plasmídeos pMt/Bip/V5-HisA
18 (Invitrogen) contendo o gene da proteína E2 de CHIKV e pCoBlast. As células
19 transfectadas foram selecionadas com 25 µg/mL de blasticidina e cultivadas em meio
20 SF900II (Invitrogen) com 25 mg/mL de gentamicina (Gibco). A expressão da proteína
21 rE2 foi induzida por 700 mM de CuSO₄ por 24 h, e a proteína foi purificada do
22 sobrenadante da cultura celular por cromatografia de afinidade com metal imobilizado
23 (usando resina Ni-NTA agarose).

24 Um controle Mock foi preparado a partir do sobrenadante de células S2 induzidas
25 por 700 mM de CuSO₄ e purificadas seguindo o mesmo protocolo (SEGATO-
26 VENDRAMETO *et al.*, 2023).

3.6 Hiperalgisia Mecânica

27
28
29 A intensidade de dor nociceptiva a estímulos mecânicos foi avaliada pelo método
30 de von Frey eletrônico (FERRAZ *et al.*, 2015), com o auxílio analgesímetro eletrônico
31 (Insight ®), um aparelho que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um
32 contador digital de força expressa em gramas (g).

33 Os camundongos foram colocados dentro de caixas de acrílico com o piso de
34 grade metálica. O contato do transdutor de pressão com a pata será feito por meio de

1 uma ponta descartável de polipropileno, entre as malhas de rede, onde se aplicou uma
2 força linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até produzir
3 uma resposta de retirada e "sacudida" (flinch) da pata estimulada. Os comportamentos
4 de pulo e o flinch de patas foram considerados como comportamentos que indicam
5 que os estímulos estão ocorrendo.

6 7 **3.7 Hiperalgisia Térmica**

8 A avaliação da hiperalgisia térmica foi realizada pelo uso do teste plantar de
9 Hargreaves. Consiste nos aquecimentos da região plantar da pata traseira do
10 camundongo, pelo uso de fonte de luz infravermelha, até que o animal apresente o
11 comportamento de retirada da pata, ou até que o aquecimento da pata chegue ao
12 tempo limite já determinado (tempo de corte de 20 segundos).

13 Os animais foram colocados dentro de compartimentos de acrílicos que ficam em
14 cima de uma superfície de vidro especial, que permite que a luz e o calor passem de
15 forma homogênea, durante 30 minutos, para a adaptação ao ambiente. Após esse
16 período, a luz infravermelha foi colocada sob cada pata traseira do animal, sendo esse
17 tempo cronometrado eletronicamente, até que o camundongo retirasse a pata, fazendo
18 com que tanto a luz quanto o relógio parem automaticamente.

19 20 **3.8 Cultura primária de neurônios e imageamento de Ca²⁺ Intracelular**

21 As imagens de cálcio foram realizadas conforme descrito anteriormente
22 (FATTORI *et al.*, 2019).

23 Após a dissecação, os DRGs (L4 – L6, ipsilateral) foram processados e
24 carregados com 1,2 µM de Fluo-4AM em meio Neurobasal-A, incubados por 30 min a
25 37°C, lavados com HBSS e filmados em microscópio confocal. Para avaliar a ativação
26 neuronal, os DRG foram estimulados com mock, iCHIKV ou rE2 e tratados com 3ng
27 de MaR2 ou veículo.

28 As placas DRGs foram gravadas por 9 min, sendo divididas em 1 min de registro
29 inicial (marca de 0 s, valores basais), seguido de estimulação com mock, iCHIKV ou
30 rE2 e tratamento com MaR2 ou veículo por 4 min na marca de 60s, com capsaicina 1
31 µM, agonista TRPV1) ou AITC (100 µM agonista TRPA1) por 3 min na marca de 360s
32 e finalizado com KCL (40 mM) por 1 min na marca de 480s. O influxo de cálcio foi
33 analisado a partir da fluorescência média medida com o Software LAS X (Leica
34 Microsystems).

3.9 Coloração e quantificação por imunofluorescência

Para a análise de presença dos canais iônicos TRPV1 e/ou TRPA1 em neurônios positivos para p-NF-kB por imunofluorescência, as amostras de gânglios da raiz dorsal (DRG) foram coletadas 7h após a indução com o CHIKV. Os gânglios da raiz dorsal (L4 – L6, ipsilateral) foram dissecados e pós-fixados em paraformaldeído (PFA 4%) por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas, duas vezes com PBS 1%, sendo transferidas para sacarose a 30%, onde ficaram por 24h e, por último, foi passada para a sacarose 30% com reagente O.C.T. (Optimal Cutting Temperature), sendo mantidas por mais 24 horas.

As peças foram embebidas em reagente O.C.T. e congeladas. As amostras então foram seccionadas em um criostato com espessura de 10 µm (CM1520, Leica Biosystem, Richmond, IL, USA). Os cortes foram depositados em lâminas de vidro carregadas positivamente, sendo assim bloqueadas e incubadas over night com anticorpo primário específico.

Os cortes de DRG foram incubados com anticorpos primários TRPV1 (1:500, Merckmiller) com p-NF-kB p65 (1:200, Santa Cruz) e TRPA1 (1:200, Invitrogen) com p-NF-kB p65 (1:200, Santa Cruz). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário Alexa Fluor 647, e/ou Alexa Fluor 488 (1:500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e DAPI para marcação do núcleo.

As imagens foram obtidas usando um microscópio confocal (Leica TCS SP₈, Leica, Wetzlar, Germany) com uma objetiva de 20x de amplificação. As imagens foram processadas utilizando o software Leica EL6000 (Leica, Wetzlar, Germany). A intensidade de fluorescência dos marcadores nos diferentes grupos foi quantificada em campos selecionados aleatoriamente. Os resultados foram calculados pela intensidade total e parcial de fluorescência dos neurônios positivos para os canais TRPV1 e TRPA1 e positivos para p-NF-kB.

3.10 Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros hiperalgésicos foram apresentados como média ± EPM (erro padrão da média) das medidas realizadas em 6 animais contidos em cada grupo, os quais passaram por 2 repetições. Foi realizada a análise de variância (TWO-WAY ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparar os grupos e doses em todos os tempos (curvas) quando as respostas da hiperalgesia foram medidas em diferentes tempos após a administração do estímulo.

1 Já para os outros ensaios, os resultados foram apresentados como \pm EPM (erro
2 padrão da média). Sendo realizada a análise de variância (ONE WAY ANOVA) seguida
3 do teste Tukey ou do Shapiro-Wilk para os experimentos com tempos específicos.
4 Foram consideradas significativas as diferenças para $P < 0.05$ para ambos os casos.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

4. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da revista Neuroscience Letters (IF: 2.5). Os resultados obtidos durante o mestrado estão descritos no artigo intitulado “**Maresin 2 (MaR2) reduces pain induced by inactivated Chikungunya vírus and its protein E2 in mice**”.

Guideline for authors – URL: <https://www.sciencedirect.com/journal/neuroscience-letters/publish/guide-for-authors>

RESEARCH PAPER

Maresin 2 (MaR2) inhibits inactivated Chikungunya vírus- and protein E2-induced joint pain in mice via TRPV1 and TRPA1 modulation

Kelly Megumi Yaekashi¹ | Mariana Stinglin¹ | Matheus Deroco Veloso da Silva¹ | Maiara Piva¹ | Mariana M. Bertozzi¹ | Rubia Casagrande² | Waldiceu A. Verri Jr.¹

¹ Department of Pathology, Centre of Biological Sciences, Londrina State University, Londrina, Brazil

² Department of Pharmaceutical Sciences, Centre of Health Science, Londrina State University, Londrina, Brazil

Correspondence

Waldiceu A. Verri. Jr., Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid KM480 PR445, PO Box 10.011, Londrina, Paraná 86057-970, Brazil. Email: waverri@uel.br; waldiceujr@yahoo.com.br

ORCID

Kelly Megumi Yaekashi 0000-0002-4047-3975

Mariana Stinglin Rosa Ribas 0000-0001-7689-7457

Matheus Deroco Veloso da Silva 0000-0001-7414-7919

Maiara Piva 0000-0003-4099-3492

Mariana Marques Bertozzi 0000-0002-0551-4313

Rubia Casagrande 0000-0002-2296-1668

Waldiceu A. Verri Jr. 0000-0003-2756-9283

1 **Abstract**

2 Chikungunya virus (CHIKV), an arboviruses, mainly transmitted by *Aedes aegypti* and
3 *Aedes albopictus*, causes a severe and debilitating infection. The main symptom is
4 severe joint pain (arthralgia), which can turn out to be a chronic disease. It is known that
5 beyond Chikungunya, the recombinant protein E2 (rE2), is part of CHIKV's structure, is
6 also responsible for transmission, infection and symptoms like hyperalgesia, as well as
7 the expression of TRPV1 channel modulation. So far, no specific treatment alternatives
8 for this type of joint pain are available, whereas potent analgesics with severe unwanted
9 effects, like opioids, have been the Only resource. Therefore, the effects of Maresin 2
10 (MaR2) as an anti-inflammatory and analgesic agent, through TRPV1 and TRPA1
11 nociceptor modulation were investigated. Mechanical and thermal hyperalgesia were
12 induced in male Swiss mice by inactivated Chikungunya or rE2 joint injections, which
13 were inhibited by intrathecal administration of MaR2. This study also demonstrated that
14 besides TRPV1 channel, TRPA1 signaling is involved in iCHIKV- and rE2-induced pain,
15 observed by behavior hyperalgesia assessment using the TRPA1 antagonist HC-
16 030031. Moreover, the roles of the both TRPV1 and TRPA1 channels on MaR2 pain
17 modulation were observed *in vitro* and *in vivo* by calcium influx Imaging and
18 immunofluorescence staining, respectively. Taken together, the results indicate MaR2's
19 efficacy as an analgesic agent for iCHIKV-induced joint pain. Additionally, we
20 demonstrated for the first time TRPA1's role in arthralgia caused by Chikungunya virus.

21

22 **Key-words:** Chikungunya; Protein E2; Hyperalgesia; Maresin 2; TRPA1 ionic channel;

23

24 **1 Introduction**

25 Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus that belongs to the Alphaviruses
26 genus, characterized by a single-stranded positive-sense RNA (1). CHIKV was first
27 identified in Tanzania in 1952, and since then has been observed in most parts of the
28 world, including countries in Europe, Africa, Asia and even the American regions.
29 Transmission to humans usually occurs through the bite of an infected mosquito, mainly
30 *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (1,2).

31 Its prevalence is mainly located in tropical/subtropical regions (3). According to a
32 Pan American Health Organization (PAHO) epidemiological update in South America
33 realized in December 2022, Dengue, Chikungunya and Zika viruses accounted for a total
34 of 3.110.442 cases, of which 271.006 corresponded to Chikungunya virus cases (PAHO/
35 WHO, 2023).

36 CHIKV, which presents in acute and chronic phases, shows symptoms
37 characterized, normally by high fever, skin rash, headaches, and muscular pain, can
38 generate hemorrhagic fever and cause shock, but more worrying is the development of
39 severe joint pain (arthralgia) (4–6). Recombinant E2 protein (rE2), is part of CHIKV's
40 structure and has an important function, being responsible for connecting to the host
41 membrane receptor and making it easier to spread infection and replication of virus
42 resulting in symptoms viewed during CHIKV infection, as edema and joint inflammation
43 (5,7–10).

44 It is in the chronic phase of CHIKV that it generates economic and social
45 implications, including the impact on the quality of life of infected patients, responsible
46 for the loss of morbidity and economic productivity (11,12). Chronic Chikungunya arthritis
47 (CCA) mainly affects people with comorbidity and middle-aged women, presenting
48 clinical signs and mechanisms of action similar to those of rheumatoid arthritis (RA) (13–
49 15). In most cases, they end up considering CCA and RA as the same disease.

50 As there is no specific antiviral treatment for CHIKV and there is no standard
51 treatment for alphavirus-induced arthritis (16–18), are prescribed medications usually to

1 treat rheumatoid arthritis, as they show positive results for Chikungunya arthritis
2 (13,15,19). Non-steroidal painkillers, or common painkillers such as opioids, are
3 prescribed to minimize pain or reduce joint damage (15). However, corticoid- or opioid-
4 based therapies can have severe side effects, like leading to hemorrhage and renal
5 failure (20) and are not suited for long treatment periods, so the search for a new, more
6 effective, and safe analgesic treatment is essential.

7 One of the therapies viewed as promising is based on the use of endogenous
8 bioactive molecules derived from omega-3 and omega-6 fatty acids that participate
9 actively in the resolution of inflammation (21). These molecules are called Specialized
10 Lipid Mediators (SPMs), a group constituted by lipoxins (derived from -6 PUFAs),
11 resolvins, protectins and maresins (derived from ω -3 polyunsaturated fatty acids)
12 (22,23), which have shown analgesic and anti-inflammatory properties in several disease
13 models (24–26). Maresin 2 (MaR2), is a DHA-derived SPM produced by macrophages,
14 with the cascade for MaR2 biosynthesis described in other studies (27–29).
15 Demonstrated analgesic and anti-inflammatory potential in different pain and
16 inflammation murine models (27,30,31) and could represent a suitable therapy for pain
17 related to Chikungunya virus infection. Therefore, this study aimed to evaluate the effects
18 of MaR2 on inactivated CHIK- and rE2-induced hyperalgesia and the neuronal effects in
19 mice.

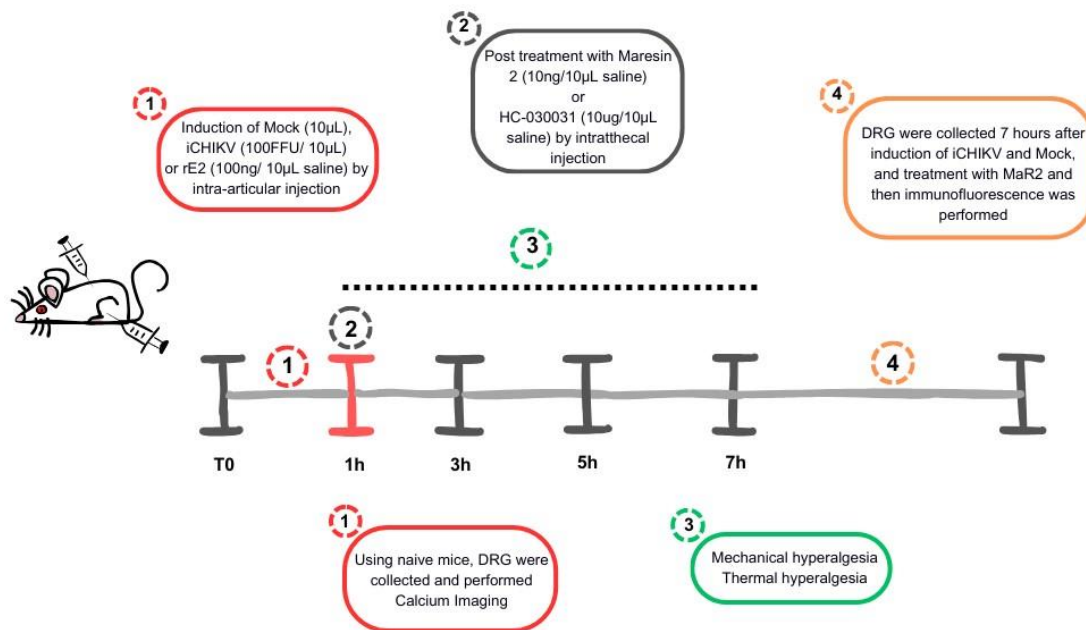
20 21 **2 Methods**

22 **2.1 Animals**

23 All experiments were performed under the guidelines of the International
24 Association for the Study of Pain guidelines and with the approval of the Londrina State
25 University Ethics Committee on Animal Research and Welfare (process number
26 114/2020). In this study, we used healthy male Swiss mice (25–30 g, 8 weeks) from
27 Londrina State University, Paraná, Brazil. Mice were randomly assigned and housed in
28 standard clear plastic cages, kept in a light/dark cycle of 12:12 hours with *ad libitum* food
29 and water. Behavioral testing was performed in a room kept at $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The
30 investigators were blinded to the treatments. All efforts were made to minimize the
31 number of animals used and their suffering. Animals were euthanized with isoflurane
32 anesthesia (5% oxygen using a precision vaporizer), followed by decapitation as a
33 confirmation method.

34 Using the experimental protocol by Segato-Vendrameto, *et al.* (2023), mice were
35 stimulated with inactivated Chikungunya virus (iCHIKV) (100UFF/ 10 μ L/animal),
36 recombinant E2 protein (100ng/ 10 μ L/ animal), Mock (10 μ L) or saline (10 μ L), by intra-
37 articular injection in the knee joint. After 1 hour, animals were treated with 1, 3 or 10ng
38 of MaR2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) or vehicle via intrathecal (100 μ L/
39 animal).

40 The doses of iCHIKV and rE2 were previously standardized by previous studies
41 in our laboratory (32), as well as the doses of MaR2 (25,31). iCHIKV- and rE2-induced
42 mice were treated with the TRPA antagonist, HC-030031, by intrathecal injection (0, 1 μ g,
43 1 μ g and 10 μ g) to investigate whether the TRPA channel has a correlation with
44 hyperalgesia. Also, to verify the neuronal action of iCHIKV, we performed *in vitro* calcium
45 imaging with collected dorsal root ganglia (DRG) from the L4–L6 spinal cord region from
46 naive mice and immunofluorescence staining *in vivo*, collecting DRG from the L2-L6
47 region.



1

2 **Figure 1: The experimental design.** For the behavioral experiment, the baseline was
 3 measured, and induced, intra-articular (i.a.), with Mock (group control), iCHIKV or rE2.
 4 After one hour, they were treated intrathecally with Maresin 2, and mechanical and
 5 thermal hyperalgesia were measured at 1, 3, 5 and 7 hours. The mechanical
 6 hyperalgesia, induced by iCHIKV or rE2, were measured and used the TRPA1
 7 antagonist, HC-030031, was used as treatment. The next step was to carry out a calcium
 8 imaging test with DRG from naive animals and immunofluorescence, with DRG collected
 9 after the seventh hour of induction.

10

11 2.2 Chikungunya virus

12 The virus used in these experiments (CHIKV BR_2015/15010) was isolated from
 13 the serum of a patient with chikungunya disease from Northeast Brazil in the year 2015.
 14 The virus was amplified, titrated by foci-forming assay in C6/36 cells and inactivated
 15 using β -propiolactone (0.025%, 72h, 4°C). The inactivated virus was concentrated by
 16 PEG 7% (polymer compounds)/NaCl 2.3% precipitation and purified using sucrose
 17 cushion. A noninfected control (Mock) was prepared in the same manner from β -
 18 propiolactone inactivated C6/36 cell-culture supernatant (32).

19 2.3 Recombinant E2 protein

20 The rE2 was expressed by *Drosophila* S2 cells. S2 cells were co-transfected with
 21 the plasmids pMt/Bip/V5-HisA (Invitrogen) containing the gene of the E2 protein from
 22 CHIKV and pCoBlast. The transfected cells were selected with 25 μ g/mL of blasticidin
 23 and cultured in SF900II (Invitrogen) medium with 25 mg/mL gentamicin (Gibco). The rE2
 24 protein expression was induced by 700 mM of CuSO₄ for 24 h, and the protein was
 25 purified from the cell-culture supernatant by immobilized metal *affinity chromatography*
 26 (using Ni-NTA agarose resin). A Mock control was prepared from the supernatant of S2
 27 cells induced by 700 mM of CuSO₄ and purified following the same protocol (32).

28

1 **2.4 Mechanical hyperalgesia**

2 Mechanical hyperalgesia was evaluated by the electronic version of von Frey's
3 test. The protocol was followed as previously described (32). The animals were tested
4 before (baseline) and at time points: 1, 3, 5, and 7 hours after MaR2 treatment and daily
5 until day 3, post iCHIKV or rE2 stimulus. Measurements were taken until the third day,
6 as according to the study already carried out with inactivated Chikungunya and rE2, the
7 induced animal presents hyperalgesia until the third or fourth day.

8 The results were calculated by dividing the difference between the average of two
9 measures after the treatment (the baseline) and the average of two measures before the
10 treatment. The investigators were blinded by the treatment (32).

11 **2.5 Thermal hyperalgesia**

12 For the heat-thermal hyperalgesia test, mice were allowed to habituate to the
13 apparatus for at least thirty to one hour during three consecutive days before the
14 measurements. After this process, a baseline measurement was obtained. To measure
15 pain sensitivity to heat hyperalgesia, mice were placed on a glass plate of a Hargreaves
16 apparatus (Model 390G, IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA).

17 The test occurs when radiant heat stimulates the plantar surface of the mice's
18 paw, and the endpoint is characterized by the removal of the paw followed by clear hind
19 paw flinching or licking movements. The animals were tested before (baseline) and at
20 time points: 1, 3, 5, and 7 hours after MaR2 treatment and daily until day 3, post iCHIKV
21 or rE2 stimulus. The results were calculated through the difference between the average
22 of two measures after the treatment (the baseline) and the average of two measures
23 before the treatment. The investigators were blinded by the treatment (32).

24 **2.6 Neuron primary culture and Calcium influx Imaging**

25 Calcium imaging was performed as previously described (31). DRGs (from L4 to
26 L6 spinal cord segments) from naive Swiss mice were collected. Naïve DRG neurons
27 were dissected into Neurobasal-A medium (NBM) (Life Technologies, Thermo Fisher
28 Scientific, Waltham, MA, USA) and dissociated in collagenase A (1 mg/mL)/dispase II
29 (2.4 U/mL) solution (RocheApplied Sciences, Indianapolis, IN, USA) in HEPES-buffered
30 saline (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) for 15 min at 37 °C. Cells were then
31 centrifuged for 5 min at 1500 rpm and resuspended in 800 µL of DMEM/10% FBS
32 containing DNase I. DRGs were then dissociated with pipettes of decreasing size and
33 centrifuged for 10 min at 1500 rpm over a 15% BSA gradient.

34 The resulting pellet was resuspended in NBM for cell counting and plating. Cells
35 (5000 DRG neurons per dish) were plated overnight in NBM supplemented with nerve
36 growth factor (50 ng/mL, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
37 USA) on laminin-coated cell culture dishes before proceeding with the assay. DRGs were
38 then loaded with 1.2 µM of Fluo-4AM in NBM supplemented with nerve growth factor,
39 incubated for 30 min 37 °C, washout three times with Hank's Balanced Salt Solution
40 (HBSS), and imaged in a Confocal Microscope (TCS SP8, Leica Microsystems,
41 Mannheim, Germany).

42 To assess neuron activation, DRG were stimulated with mock, iCHIKV or rE2 and
43 pre-treated with 10 ng of MaR2 or vehicle one hour before starting the experiment. DRGs
44 plates were recorded for 9 min, divided in 1 min of initial recording (0 s mark, baseline
45 values), followed by stimulation with mock, iCHIKV or rE2 for 4 min at 296 s mark, and
46 capsaicin (1µM in HBSS, TRPV1 agonist) or AITC (100 µM in HBSS, TRPA1 agonist)
47 for 4 min at the 476-s mark, and KCL (40Nm) for 1 min at the 540 s mark. Next, the data
48 was analyzed on Graphpad Prism.

49

2.7 Immunofluorescence staining and quantification

Immunofluorescence was performed using DRGs (from L4 to L6 spinal cord segments) collected from Swiss mice 7h after intra-articular stimulus with CHIKVi. DRGs were post-fixed with 4% PFA overnight at 4° C. The following day, samples were washed with PBS 1% and kept on 30% sucrose overnight at 4° C. The solution was replaced with 30% sucrose + O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) for more than 24 hours. DRGs were embedded in O.C.T. compound and 10um sections were sliced in a cryostat (CM1520, Leica Biosystem, Richmond, IL, USA) and processed for immunofluorescence. Before incubation with antibodies, slides were blocked with Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS, 0.3% Triton X-100 (0.3% PBST). Primary antibodies used in this study were: anti-TRPA1 (1:200, Invitrogen) or anti-TRPV1 (1:500, Merckmiller) and p-NF-kB p65 (1:200, Santa Cruz).

All primary antibodies were incubated over night at 4° C and then washed four times with 0.3% PBSt before proceeding with secondary antibody incubation. Secondary antibodies used in this study were: anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:500, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); anti-guinea pig Alexa Fluor 488 (1:500,); anti-mouse Alexa Fluor 647 (1:500, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); and DAPI. All secondary antibodies were incubated for 60 min at room temperature and after, stained slides were then washed three times with 0.3% PBST and mounted in Fluoromount-G compound. The images were taken in a Confocal Microscope (TCS SP8 Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and fluorescence intensity was measured using software Leica EL6000 (Leica, Wetzlar, Germany).

2.8 Data and statistical analysis

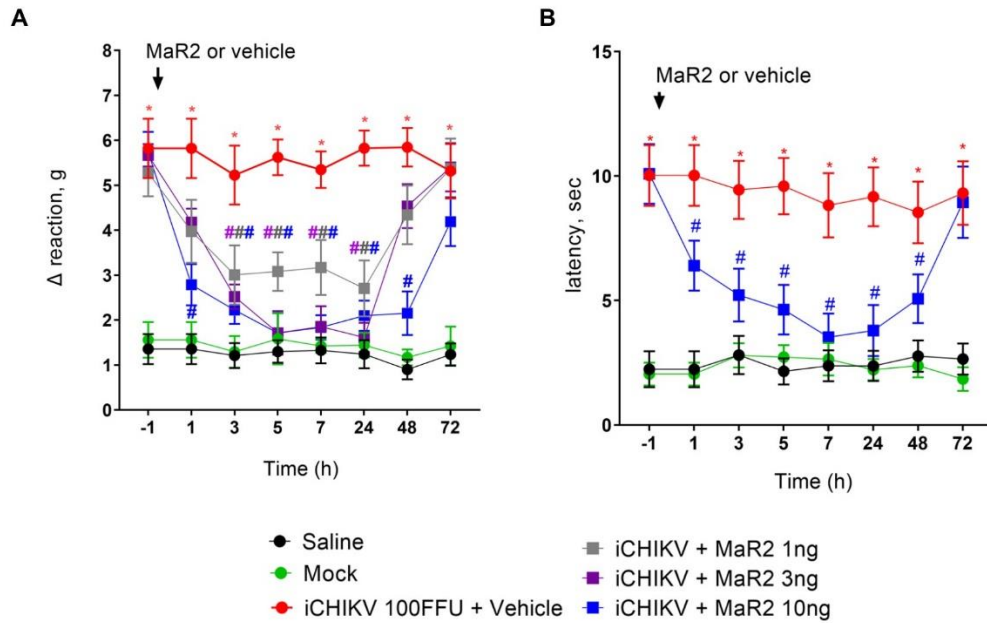
Data were analyzed using GraphPad Prism statistical software (GraphPad Prism software version 6.0). Results are presented as means ± SEM of measurements made with six mice per group. Each experiment was conducted twice. Two-way ANOVA, followed by the Tukey post-test, was used to analyze data from multiple-moment experiments (mechanical and thermal hyperalgesia and edema). One-way ANOVA was applied, followed by Tukey's post-test or Shapiro-Wilk test for experiments with specific times. Significant statistical differences were considered when P <0.05.

3 Results

3.1 Maresin 2 inhibits iCHIKV-induced mechanical and thermal hyperalgesia.

The joint pain was stimulated by 100 FFU of iCHIKV, Mock (10 µL) or saline (10 µL) injected in mice knee joints. One hour after stimulus, animals received treatment with 1ng, 3ng or 10ng of MaR2 or vehicle (10% ethanol) intrathecally (i.t.). All doses were able to reduce mechanical hyperalgesia induced by this inactivated virus, however only the dose of 10 ng demonstrated analgesia starting in the first hour and lasting until the 2nd day after treatment, indicating that the effect of MaR2 was dose-dependent. Therefore, the dose of 10 ng of MaR2 was chosen for the following experiments. Experimental groups were compared to saline and mock groups as controls.

After selecting the 10 ng for MaR2 treatments, we tested if this lipid could inhibit thermal hyperalgesia. The results indicate that MaR2 reduces thermal hyperalgesia. The analgesic effect started in the first hour until the 2nd day after treatment, similar to the results observed after mechanical hyperalgesia testing, which indicate that the selected dose of MaR2 was able to reduce both thermal and mechanical hyperalgesia.



1

2 **Figure 1: MaR2 can reduce mechanical and thermal hyperalgesia induced by**
 3 **iCHIKV.** Mice received intra-articular (i.a.) injections of inactivated CHIKV virus (100
 4 FFU, 10 uL saline), Mock (negative control, 10 uL) or saline (10 uL), and were treated
 5 intrathecally (i.t.) with Maresin 2 (1ng, 3ng and 10ng). Mechanical (**A**) and thermal (**B**)
 6 hyperalgesia were evaluated 1–7 hours after injection and in the following three days.
 7 The results are presented as the mean ± SEM of six mice per group per experiment and
 8 are representative of two independent experiments. *P<0.05 compared to the mock
 9 group; #P<0.05 compared to the iCHIKV group. Two-way ANOVA followed by Tukey's
 10 test.

11

12 **3.2 Maresin 2 inhibits mechanical and thermal hyperalgesia induced by**
 13 **recombinant E2 protein from Chikungunya virus.**

14 The first set of experiments indicated that the dose of 10 ng of MaR2 was effective
 15 in reducing mechanical and thermal hyperalgesia induced by inactivated CHIKV.
 16 Therefore, the next step was to evaluate whether MaR2 could reduce mechanical and
 17 thermal hyperalgesia induced by structural protein E2, which is presented on the
 18 envelope of CHIKV. It was observed that in both mechanical and thermal hyperalgesia
 19 tests, MaR2 showed analgesic effects that started in the first hour and lasted until the
 20 seventh hour, not showing any effect in 1nd or 2nd days after stimulus.

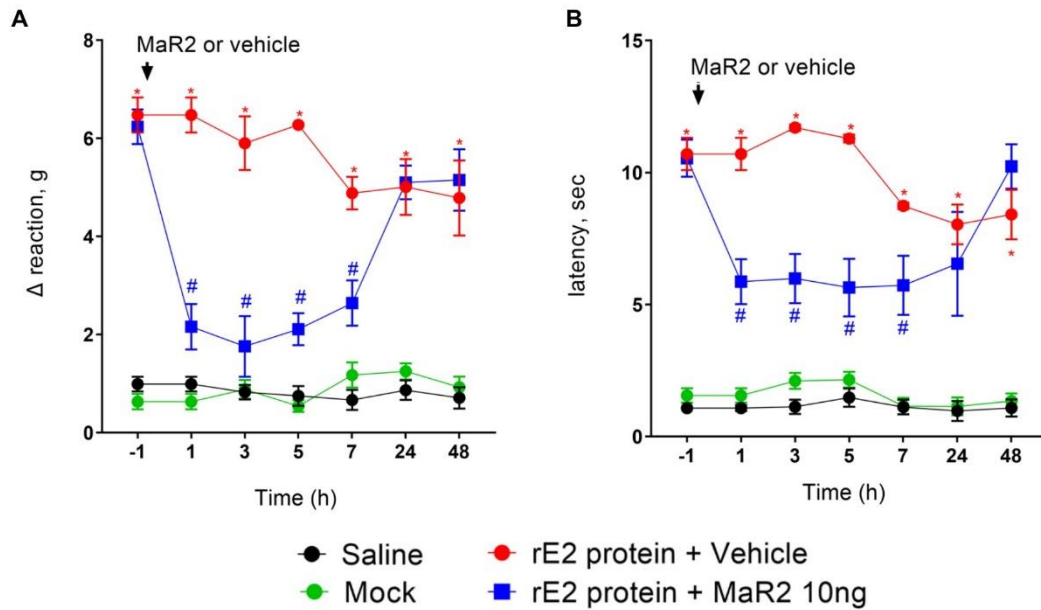


Figure 2: MaR2 reduces mechanical and thermal hyperalgesia induced by rE2 protein from Chikungunya virus. Animals received intra-articular (i.a.) injections of rE2 (100 ng, 10 μ L saline), Mock (control, 10 μ L) or saline (control, 10 μ L). The mechanical (A) and thermal (B) hyperalgesia were evaluated 1–7 hours after treatment intrathecally (i.t.) with 10 ng of MaR2, and daily for two days after treatment. The results are presented as the mean \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two independent experiments. *P<0.05 compared to the mock group; #P<0.05 compared to the rE2 group. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.

3.3 iCHIKV increases calcium influx by activation on TRPV1 and TRPA1 channels. MaR2 can act in both of channels, decreasing Ca⁺ influx, and leading to reduced nociceptor activation.

In summary, animals stimulated with inactivated CHIKV or rE2 developed mechanical and thermal hyperalgesia.

Segato-Vendrameto, *et al* (2023), demonstrated that the mechanical and thermal hyperalgesia present during infection by iCHIKV or by the action of its E2 protein occurs due to the ability to modulate the activation of the TRPV1 channel, leading to nociception. Also, MaR2 used as a treatment is known to have the capacity to inhibit or reduce the activation of both TRPV1 and TRPA1 channels, unlike MaR1, which modulates only TRPV1 channels. (25,31,33).

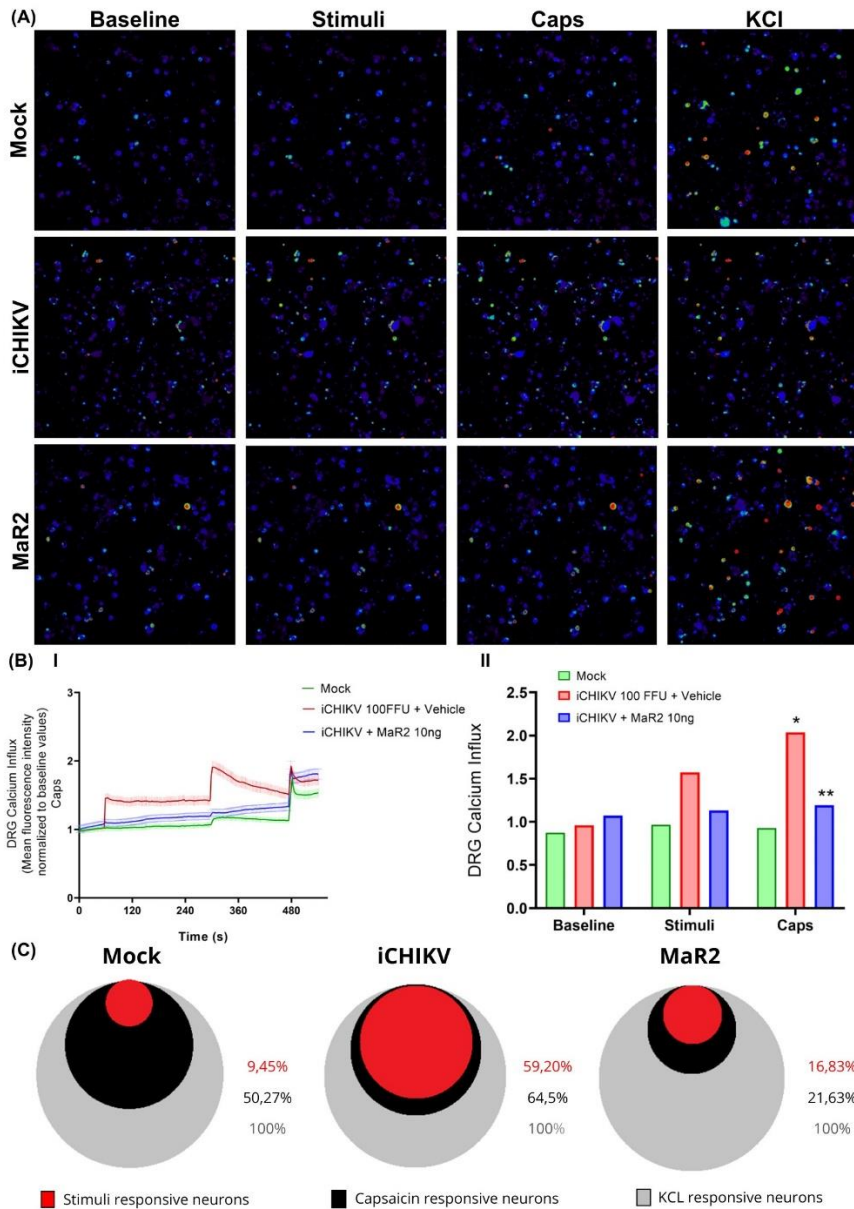
So to verify and have support for these findings, it was decided to investigate whether the ion channel, TRPV1, already described, have relation with the virus, and if TRPA1, which does not present any information regarding this subject, can trigger the formation of hyperalgesia present during infection (32), and whether Maresin 2 can inhibit both of these channels, leading to analgesic effect, like was observed in the behavior experiment.

This next step is important because in the *in vivo* experiments, non-neuronal cells could contribute secreting hyperalgesia-inducing mediators, therefore, through the cell culture of axotomized DRG-derived neuronal somas, we can observe the direct effect of iCHIKV on neurons receptor's activation. Culture plates were pretreated with MaR2 or vehicle before induction with inactivated Chikungunya, followed by the activation with

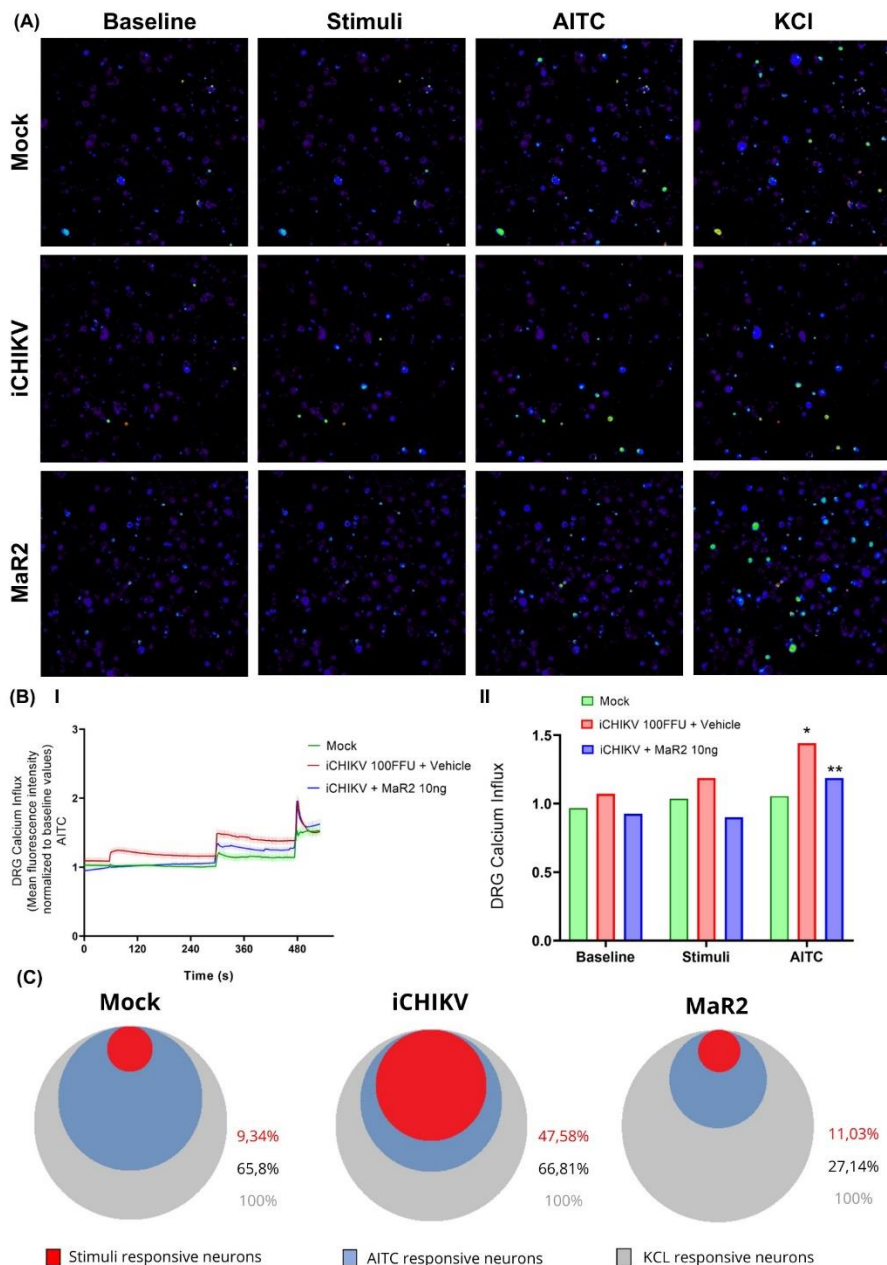
1 capsaicin (TRPV1 agonist) or AITC (TRPA1 agonist), and finally adding the activation
 2 control (KCL).

3 The representative images of the aforementioned time points can be observed
 4 on panels A of Figure 3 e 4, as well as the representative traces of calcium levels (mean
 5 \pm S.E.M. – panels BI) and the bar graphic representing the calcium influx peaks (mean
 6 \pm S.E.M. – panels BII), demonstrating that iCHIKV activates DRG neurons. Venn
 7 diagrams (panels C) show the percentage of the population of neurons, induced by
 8 CHIKVi, that were responsive to TRPV1 or TRPA1 and how MaR2 was able to modulate
 9 the activity of this channel by reducing or inhibiting its activity.

10 The data demonstrated by Figure A-C, along with the findings described by
 11 Segato-Vendrameto *et al.* (2023), show direct neuronal activation by stimuli. Additionally,
 12 this data supports the *in vivo* neuronal activation observed in Figures 1 and 2, and is
 13 indicative of direct neuronal activation by iCHIKV, even though the exact receptors being
 14 activated remain to be confirmed, because co-activation, potentiation or even activation
 15 may occur per other receptors, which can help by changing the conformation of TRP,
 16 also leading to the observed inhibition.



1 **Figure 3: Nociceptor TRPV1⁺ activation by iCHIKV can be inhibited by Maresin 2 *in***
 2 ***vitro*.** (A - C) iCHIKV-induced TRPV1 activation. (A) To verify TRPV1 activation *in vitro*,
 3 plates containing naive DRG neurons were subjected to analysis for 9 min: 1 min of initial
 4 reading for baseline, followed by pre-treatment with MaR2 (100nM in HBSS) or Vehicle,
 5 at 56 sec mark, stimulus with iCHIKV (100FFU in HBSS, 10 μ l) or Mock (control, 10 μ l in
 6 HBSS) were added and recorded for 4 minutes, at 296 sec mark stimulus with capsaicin
 7 (Caps, 1 μ M in HBSS, TRPV1 agonist) were added and recorded for 3 min, and finally at
 8 476 sec mark, KCL (40mM) was added and recorded for 1 min. Panels (BI) refer to the
 9 fluorescence intensity traces, and (BII) refers to the mean fluorescence intensity of
 10 calcium influx in each stimulus and/or treatment mark throughout the 9 min of recording.
 11 (C) Venn diagrams show the percentage of the population of neurons, induced by
 12 iCHIKV, that were responsive to TRPV1, and how MaR2 was able to modulate the
 13 activity of this channel by reducing or inhibiting its activity. Results are expressed as
 14 mean \pm s.e.m. of 40 DRG neurons per plate (each plate is a neuronal culture from six
 15 naïve mice) per group, two independent experiments *P<0.05 vs. Mock, **P<0.05 vs.
 16 iCHIKV alone. Two-way repeated measures ANOVA, followed by Tukey's post-test.



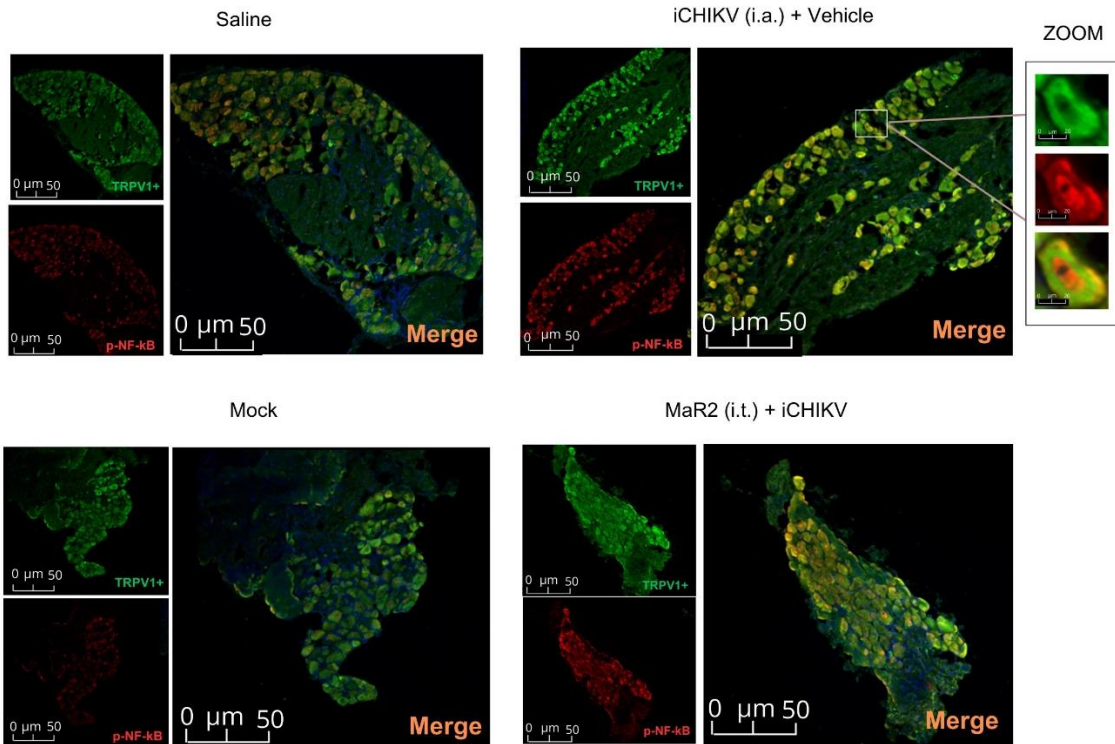
1 **Figure 4: Nociceptor TRPA1⁺ activation by iCHIKV can be inhibited by Maresin 2**
2 ***in vitro*. (A - C) iCHIKV-induced TRPA1 activation. (A)** To verify TRPA1 activation *in*
3 *vitro*, plates containing naive DRG neurons were subjected to analysis for 9 min: 1 min
4 of initial reading for baseline, followed by pre-treatment with MaR2 (100nM in HBSS) or
5 Vehicle, at 56 sec mark, stimulus with iCHIKV (100FFU in HBSS, 10 μ l) or mock (control,
6 10 μ l in HBSS) were added and recorded for 4 minutes, at 296 sec mark stimulus with
7 AITC (100 μ M in HBSS, TRPA1 agonist) were added and recorded for 3 min, and finally
8 at 476 sec mark, KCL (40mM) was added and recorded for 1 min. Panels **(BI)** refer to
9 the fluorescence intensity traces, and **(BII)** refers to the mean fluorescence intensity of
10 calcium influx in each stimulus and/or treatment mark throughout the 9 min of recording.
11 **(C)** Venn diagram shows the percentage of the population of neurons induced by
12 iCHIKV, that were responsive to TRPA1, as well as how MaR2 was able to modulate the
13 activity of this channel by reducing or inhibiting its activity. Results are expressed as
14 mean \pm s.e.m. of 40 DRG neurons per plate (each plate is a neuronal culture from six
15 naive mice) per group, two independent experiments *P<0.05 vs. Mock, **P<0.05 vs.
16 iCHIKV alone. Two-way repeated measures ANOVA, followed by Tukey's post-test.

17

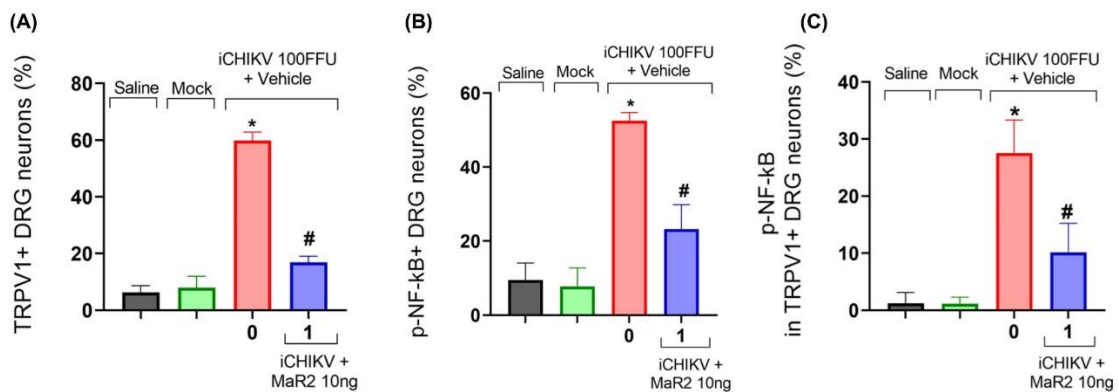
18 **3.4 MaR2 reduces NF-kB p65 and of TRPA1⁺- and TRPV1⁺-neuron activation after** 19 **iCHIKV stimulus.**

20 In the previous test, DRGs from naive animals demonstrated greater activation
21 of TRPV1 and TRPA1 channels after iCHIKV stimulus, *in vitro*, when compared to a
22 mock group. Additionally, in groups that were stimulated with iCHIKV and treated with
23 MaR2, the calcium influx-induced fluorescence signal was reduced. This indicates that
24 nociceptor ion channels are related to hyperalgesia and that this state can be reversed
25 when treated with the lipid Maresin 2. To observe TRPV1 and TRPA1 expression *in vivo*
26 and their relation to the neuroinflammation process, immunofluorescence labeling of
27 TRPV1/p-NFkB and TRPA1/p-NFkB in DRG neurons was carried out.

28 Immunofluorescence was performed to verify whether the channels of interest,
29 TRPV1 and TRPA1, are being expressed in neurons in this pain model. It was confirmed
30 that in the stimulated group there was a greater expression of TRPV1 and TRPA1-
31 positive neurons, and this can be confirmed by the marker, p65 NFkB, chosen to verify
32 the activity, which was also expressed in these neurons. This demonstrates that the
33 inactivated virus can directly modulate the activity of these channels, where neurons
34 express receptors to detect both iCHIKV and the agonists' capsaicin (TRPV1) and AITC
35 (TRPA1), leading to greater potentiation, generating hyperalgesia. And this was reversed
36 when they were treated with MaR2. The expression of TRPV1 and TRPA1 had their
37 expression reduced even in the presence of the stimulus, showing the ability of MaR2 to
38 inhibit or reduce the activity of ion channels; that is, iCHIKV was unable to exacerbate
39 the activity of the channels, leading to the analgesic effect observed in behavioral
40 experiments.

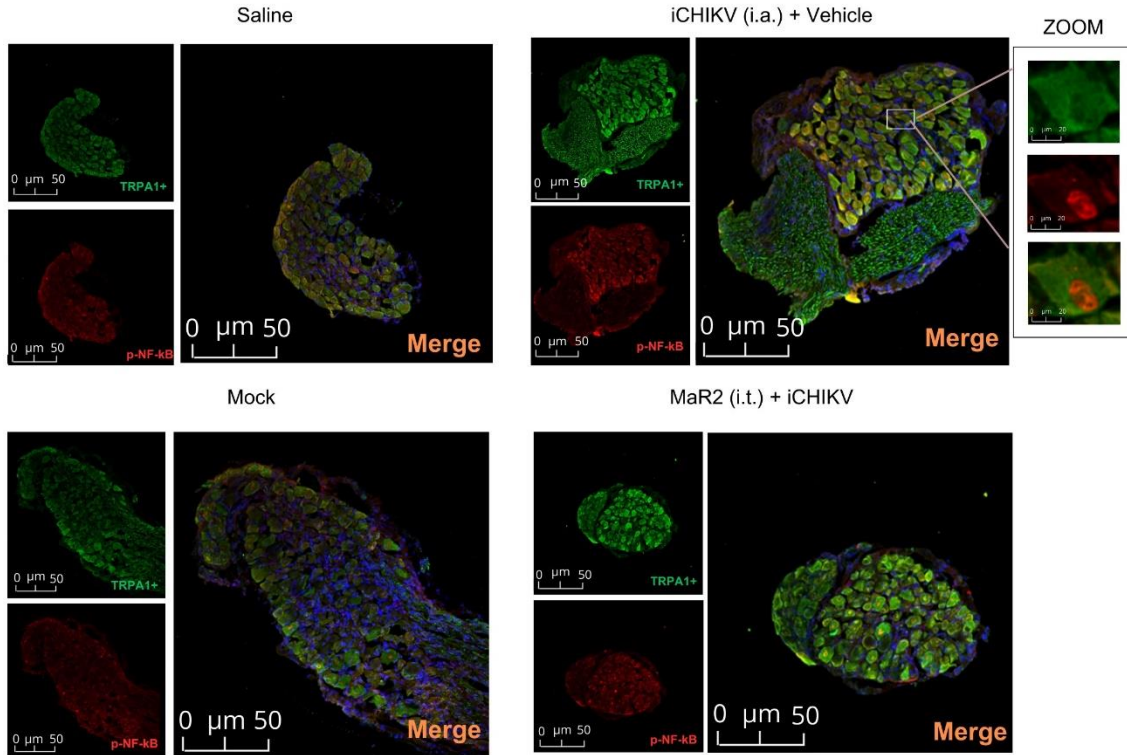


1

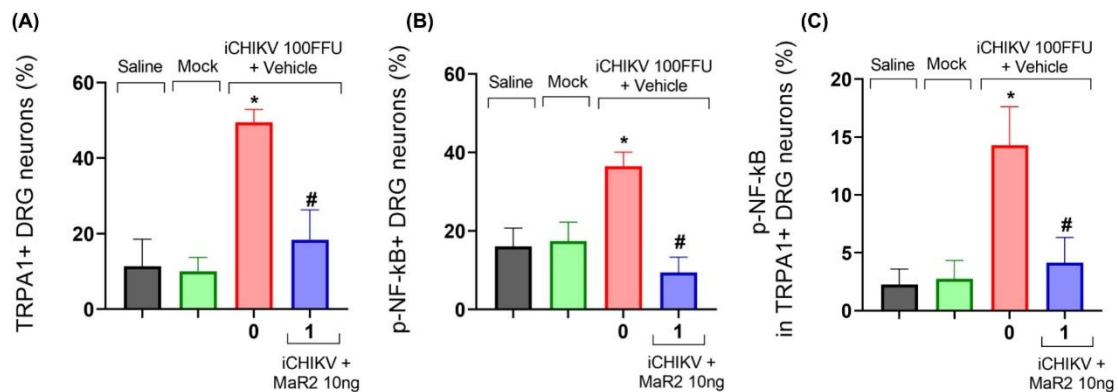


2

3 **Figure 5: iCHIKV increases TRPV1+ neurons and NF-kB p65 activity of DRG**
 4 **neurons, and it was reduced when treated with maresin 2.** DRG neurons were
 5 collected 7 h after intra-articular (i.a.) injection of inactivated CHIKV virus (100 FFU, 10μL
 6 saline), Mock (negative control, 10μL) and saline (10μL) and treated intrathecally (i.t.)
 7 with 10ng of Maresin 2. (A - B) Percentage of TRPV1+ (488) or p-NFkB p65 (647)
 8 activated DRG neurons without stimulus or stimulated with iCHIKV, and treated with
 9 MaR2 or vehicle. (C) Percentage of TRPV1+ expression on p-NFkB p65 activated DRG
 10 neurons. Results are presented as the mean ± SEM of six mice per group per experiment
 11 and are representative of two independent experiments. *P<0.05 compared to Mock
 12 group; #P<0.05 compared to the vehicle group. One-way ANOVA followed by Shapiro-
 13 Wilk post-test.



1



2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

Figure 6: iCHIKV increases TRPA1+ neurons and NFkB p65 activity on DRG neurons, effects inhibited after Maresin 2 treatment. DRG neurons were collected 7 h after intra-articular (i.a.) injection of inactivated CHIKV virus (100 FFU, 10 μ L saline), Mock (negative control, 10 μ L) and saline (10 μ L) and treated intrathecally (i.t.) with 10ng of Maresin 2. **(A - B)** Percentage of TRPA1+ (488) or p-NF-kB p65 (647) activated DRG neurons without stimulus or stimulated by iCHIKV and treated with MaR2 or vehicle. **(C)** Percentage of p-NFkB p65 activation in TRPA1+ DRG neurons. Results are presented as the mean \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two independent experiments. *P<0.05 compared to Mock group; #P<0.05 compared to the vehicle group. One-way ANOVA followed by Shapiro-Wilk posttest.

13

14

15

3.5 HC-030031, a TRPA1 antagonist, reduces mechanical hyperalgesia induced by inactivated Chikungunya virus and/or recombinant E2 protein.

16

17

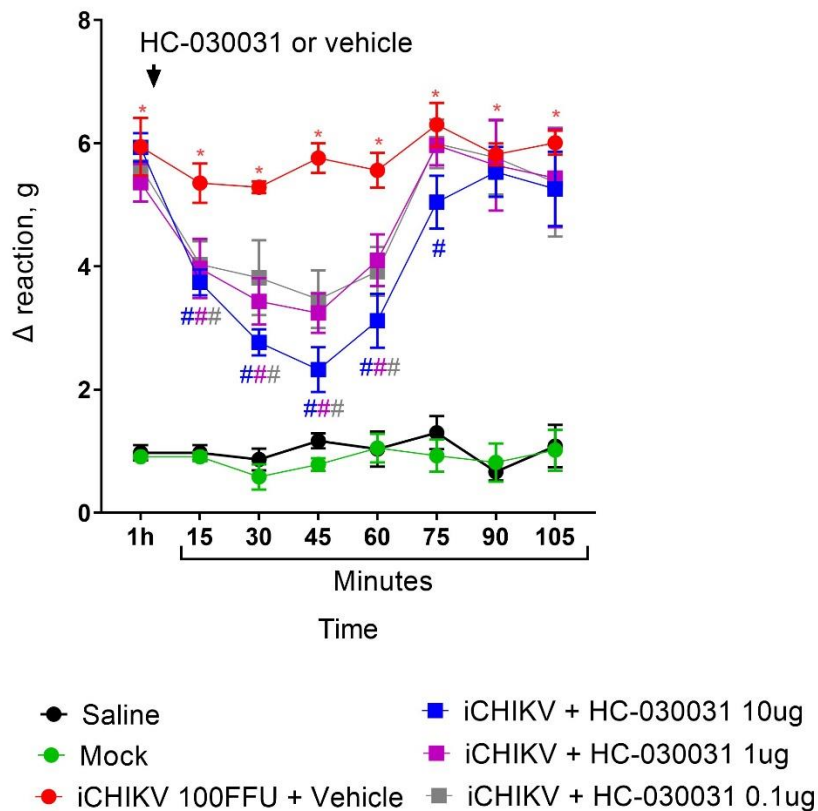
18

Behavioral data demonstrated that inactivated chikungunya and the E2 protein lead to the formation of mechanical and thermal hyperalgesia. Segato-Vendrameto., *et al.* (2023) showed that the modulation of the TRPV1 ion channel is related to the

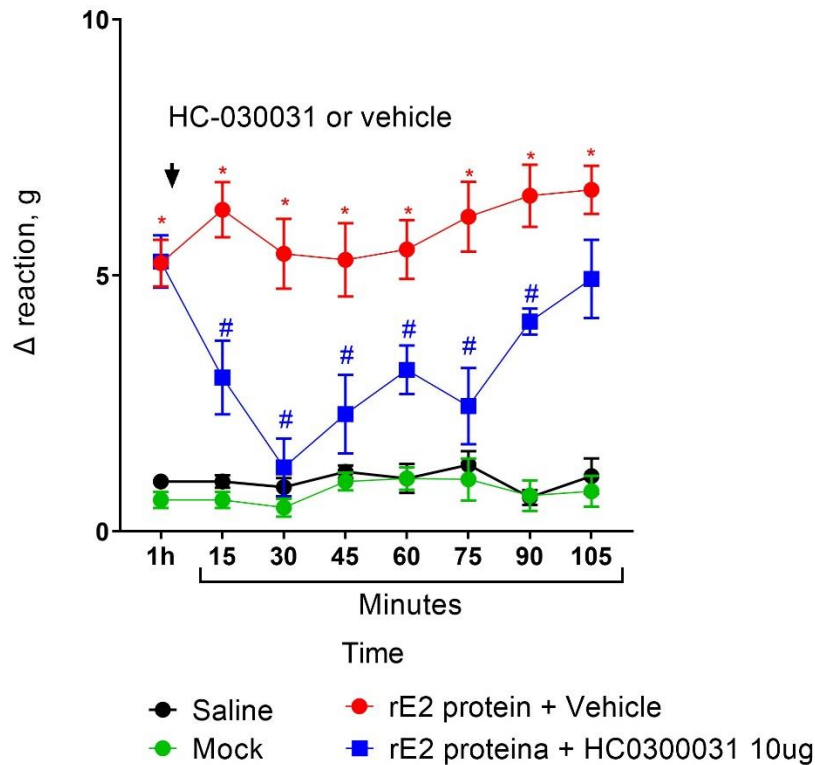
1 presence of the inactivated virus and its protein. With the data obtained by calcium
 2 imaging and immunofluorescence, we confirmed that in addition to the TRPV1 channel,
 3 iCHIKV can also activate the action of the TRPA1 channel. Furthermore, when they were
 4 treated with Maresin 2, the lipid was able to act on these channels, inhibiting or reducing
 5 their action, demonstrating analgesic capacity. Indicating that the hyperalgesia present
 6 during behavioral tests is occurring due to the ability of the inactivated virus and rE2 to
 7 modulate the channels present in nociceptors.

8 To make sure that the TRPA1 channel is also affected by iCHIKV and rE2, HC-
 9 030031, a TRPA1 antagonist, was used to confirm this fact. To perform mechanical
 10 hyperalgesia, HC-030031 was tested, intrathecally (i.t.), in two stages: one with doses
 11 10 µg, 30µg and 50µg (Complementary figure 1), which induced back itching, so after,
 12 we tried to reduce the doses to 0,1 µg, 1 µg and 10 µg (Figure 7).

13 The next step, using the choosing dose, 10 µg, aimed to determine if HC-030031,
 14 also could reduce mechanical hyperalgesia induced by the recombinant E2 protein. In
 15 this case, blocking the channel, showed lower hyperalgesia.



16
 17 **Figure 7: HC-030031, a TRPA1 antagonist, reduces mechanical hyperalgesia**
 18 **induced by iCHIKV.** Mice received intra-articular (i.a.) injection of iCHIKV (100 FFU,
 19 10µL saline) or mock (negative control, 10 µL), and were treated intrathecally with HC-
 20 030031 (10µg, 1µg and 0,1µg). The mechanical hyperalgesia was evaluated for a total
 21 of 105 minutes, with an interval of 15 minutes between each measure. Results are
 22 presented as the mean ± SEM of six mice per group per experiment. * p < 0.05 compared
 23 to Mock group; ANOVA followed by Tukey's test.



1

2 **Figure 8: HC-030031, a TRPA1 antagonist, reduces mechanical hyperalgesia**
 3 **induced by rE2** Mice received intra-articular (i.a.) injection rE2 (100 ng, 10μL saline) or
 4 Mock (negative control, 10 μL), and treated intrathecally with HC-030031 (10μg, 1μg and
 5 0,1μg). The mechanical hyperalgesia was evaluated for a total of 105 minutes, with a 15
 6 minutes interval between each measure. Results are presented as the mean ± SEM of
 7 six mice per group per experiment. * p < 0.05 compared to Mock group; ANOVA followed
 8 by Tukey's test.

9

10 4 Discussion

11 Although classified as a self-limiting infection, Chikungunya (CHIKV) can
 12 progress to a chronic disease for patients at risk, causing severe joint pain (34). The E2
 13 protein can also generate similar symptoms, for being able to replicate viral genes and
 14 directly infect macrophages, increasing joint recruitment of inflammatory cells, and
 15 leading to synovitis, edema, and myositis (3,8,35).

16 Maresin 2 (MaR2) was selected for this study, in the search for a promising new
 17 treatment for CHIKV. This lipid, has demonstrated the ability to impair neuroinflammatory
 18 factors activity *in vivo* and *in vitro*, being known for its pro-resolutive, anti-inflammatory,
 19 and analgesic effects, as well as for reducing and/or inhibiting the action of nociceptor
 20 neurons, via TRPV1 and TRPA1 channel modulation (31).

21 Using the murine joint pain model, animals were induced intra-articularly (i.a) by
 22 Mock, iCHIKV, or protein E2, in doses previously defined (32). Groups, receiving iCHIKV
 23 or rE2 stimuli, developed mechanical and thermal hyperalgesia. And both of cases were
 24 reversed using 10 ng of Maresina 2 administered intrathecally (i.t.), showing lipid's
 25 efficiency on analgesic effect, for relieving iCHIKV- or rE2-induced pain (Fig 1 and 2).
 26 These results indicated that structure E2, also has a part in Chikungunya virus-induced
 27 joint pain, leading to symptoms already described (7,32,36).

28 It is known that iCHIKV and rE2 can directly activate the nociceptor TRPV1 channel in
 29 mice, inducing hyperalgesia (32). However, studies regarding the TRPA1 channel's role

1 in pain establishment were still lacking. It is believed that TRPA1's physiological function
2 is to be a neuronal chemosensor, sensing and responding to noxious compounds,
3 mediating itch, neurogenic inflammation and pain (37). Additionally, TRPA1 is believed
4 to be activated by noxious mechanosensation and cold thermosensation (38,39).
5 Knowing that TRPV1 and TRPA1 channels are commonly co-related in nociceptive
6 neurons (39,40), leading to nociception, it was decided to collect mice's dorsal root
7 ganglions (DRGs) to perform calcium imaging and immunofluorescence.

8 Results obtained by calcium Imaging, showed that using capsaicin and AITC,
9 agonists for TRPV1 and TRPA1 neurons, indicated a relationship with the development
10 of hyperalgesia during iCHIKV infection (Figs. 3 and 4). The data demonstrated a greater
11 increase in the stimulated group after capsaicin than with AITC, compared to the control
12 group, Mock (Fig. 3-4BI). This result can be explained due to the fact that TRPA1 acts
13 more like a neuronal chemosensor to noxious compounds, as can be observed in its
14 ability to detect bacterial endotoxins such as lipopolysaccharide (LPS) (37,41), thus not
15 being directly activated after CHIKV infection as it appears to occur with TRPV1 (42).

16 Plates treated with MaR2 lowered calcium influx, proving its capacity of acting on
17 nociceptive neurons, inhibiting or reducing TRPV1⁺ and TRPA1⁺ neuron activation,
18 which would lead to analgesic effects in *in vivo* settings (31) (Fig 3-4C). Nonetheless,
19 this result confirms that TRPA1 is, at least partially, a modulator in CHIKV-induced
20 nociception, like TRPV1 (32).

21 In corroboration with our calcium imaging data, the following step was to perform
22 immunofluorescence tests labeling TRPV1 or TRPA1 channels in association with an
23 inflammatory indicator. To perform this experiment, animals were induced with iCHIKV
24 or Mock, and treated with MaR2 or vehicle, and seven hours after stimuli, DRGs were
25 harvested. After following all the steps already described on material and methods,
26 antibodies anti-TRPV1, anti-TRPA1 and anti-NF-kB p65 (Nuclear factor kappa B) were
27 used to incubate the slides. NF-kB, especially its p65 subunit, was chosen for playing an
28 important role during cellular activation since it is known to be translocated from the
29 cytoplasm to the nucleus after its phosphorylation, leading to the transcription of pro-
30 inflammatory cytokines, and aiding inflammation development and progression (43–47).

31 Compared to the control group, the fluorescence intensity was higher in the group
32 stimulated with iCHIKV, showing the direct relationship in the activation of TRPV1 (32)
33 (Figure 5) and TRPA1 channels in the presence of this virus (Figure 6). The intensity of
34 NF-kB was greater in the presence of neurons with expression of the TRPV1 channel
35 (Figure 5C) than TRPA1 (Figure 6C), and this is due to the presence of iCHIKV and the
36 ability of TRPV1 to modify the functioning of the cell, which ends up inducing more
37 nuclear translocation of the p65 (42,48). The lower intensity in TRPA1 neurons occurs
38 not directly with nuclear translocation like the TRPV1 channel, but because of TNF- α , a
39 key proinflammatory cytokine, that upregulates TRPA1 via NFB and hypoxia-inducible
40 factor 1 α (HIF-1 α), increasing TRPA1 promoter activity (49–51) in human synoviocytes.

41 Based on these results, to confirm whether the TRPA1 channel also has its
42 activation modulated by iCHIKV and rE2, we decided to use HC-030031, a TRPA1
43 antagonist, to conduct mechanical hyperalgesia. It has been previously demonstrated
44 that this antagonist can suppress mechanical hyperalgesia in an inflammatory and in a
45 neuropathic pain model (38,40), indicating it would be suitable for this study as well.

46 Animals stimulated with iCHIKV and/or rE2, when treated with HC-030031,
47 intrathecally, managed to block the channel, reducing hyperalgesia. This shows that the
48 inactivated virus and its protein act directly on TRPA1, modulating the channel's
49 activation. When the stimulated animals received doses of 50 μ g and 30 μ g, the animals
50 were itching the treated region, showing an adverse effect due to the inhibition of the
51 TRPA1 channel. (Supplementary Figure 1).

52 It is known that the TRPV1 and TRPA1 channels, in addition to modulating pain,
53 are also capable of modulating histaminergic and non-histaminergic itching behavior
54 (52), and it is believed that pain can be dominant over itch, and when the painful stimuli
55 are removed, the itching sensation predominates (53). That's why it was decided to do a

1 new test, using smaller doses (Figure 7). In both tests, the 10 µg dose showed the best
2 result, blocking the channel and reducing hyperalgesia more efficiently.

3 To confirm and complement the previous result, E2 protein was used as stimulus
4 too (Figure 8). Also, in this test, HC-030031 blocked the channel, and reduced
5 mechanical hyperalgesia. With this, we conclude that TRPA1 is also related to
6 hyperalgesia induced by iCHIKV and rE2.

7 8 9 10 **5 Conclusion**

11
12 Nowadays, Chikungunya treatment is based on symptom relief, and the
13 development of effective non-opioid treatments for the prevention and resolution of
14 neuroinflammation and CHIKV-induced joint pain is of utmost urgency.

15 According to our findings, TRPV1 and TRPA1 nociceptive activation can induce
16 mechanical and thermal hyperalgesia induced by inactivated Chikungunya and its
17 structural component, protein E2. Likewise, Maresin 2 demonstrated an analgesic effect
18 modulating TRPV1 and TRPA1 channel activation, showing a broader effect of this lipid
19 mediator on TRP channels, when compared to the other member of the same family,
20 Maresin 1.

21 Based on the premise that pain is regulated by nociceptive modulation, the
22 inhibition of TRPV1 and TRPA1 on nociceptive neurons indicates their potential as
23 targets to create alternative analgesic treatment options (54,55) with reduced side
24 effects, which is what affects patients the most. Maresin 2 presents itself as a promising
25 analgesic and pro-resolutive alternative treatment for the symptoms elicited by this virus
26 and may help patients, in the future, minimize the major Chikungunya-derived
27 complication, severe joint pain.

28 29 30 31 **Acknowledgments and Funding**

32 The authors acknowledge the financial support of PRONEX grant supported by
33 SETI/Araucária Foundation and MCTI/CNPq; and Paraná State Government (agreement
34 014/2017, protocol 46.843); Funding Authority for Studies and Projects and State
35 Secretariat of Science, Technology and Higher Education (MCTI/FINEP/CT-INFRA-
36 PROINFRA, Brazil (grant agreements 01.12.0294.00 and 01.13.0049.00); Universal
37 grant supported by CNPq; Masters and PhD scholarship from Coordination for the
38 Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil, finance code 001); CAPES
39 and CNPq Post-Doc fellowships. R.C. and W.A.V.J. acknowledge the CNPq Researcher
40 fellowship. We also thank the support of CMLP-UEL for the access to equipment free of
41 charge.

42 43 **References**

44
45 1. Khongwichit S, Chansaenroj J, Chirathaworn C, Poovorawan Y. Chikungunya virus
46 infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. J
47 Biomed Sci [Internet]. 1º de dezembro de 2021 [citado 6 de dezembro de 2023];28(1):1–17.
48 Disponível em: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-021-00778-8>

49 2. Matusali G, Colavita F, Bordi L, Lalle E, Ippolito G, Capobianchi MR, et al. Tropism of the
50 Chikungunya Virus. Viruses 2019, Vol 11, Page 175 [Internet]. 20 de fevereiro de 2019 [citado 6

- 1 de dezembro de 2023];11(2):175. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-24915/11/2/175/htm>
- 3 3. Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordi L. Chikungunya virus
4 infection: an overview [Internet]. Vol. 36, NEW MICROBIOLOGICA. 2013. Disponível em:
5 <http://www.cdc.gov/chikungunya/map/index.html>,
- 6 4. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus:
7 an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. Vol. 17, The Lancet
8 Infectious Diseases. Lancet Publishing Group; 2017. p. e107–17.
- 9 5. da Cunha R V., Trinta KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review.
10 Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2017 [citado 20 de dezembro de 2023];112(8):523–31.
11 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28767976/>
- 12 6. Rudd PA, Wilson J, Gardner J, Larcher T, Babarit C, Le TT, et al. Interferon response factors
13 3 and 7 protect against Chikungunya virus hemorrhagic fever and shock. J Virol [Internet]. 15 de
14 setembro de 2012 [citado 20 de dezembro de 2023];86(18):9888–98. Disponível em:
15 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22761364/>
- 16 7. Hoarau JJ, Jaffar Bandjee MC, Krejbich Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, et al.
17 Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite
18 of a robust host immune response. J Immunol [Internet]. 15 de maio de 2010 [citado 31 de
19 janeiro de 2024];184(10):5914–27. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20404278/>
- 20 8. Fox JM, Long F, Edeling MA, Lin H, Van Duijl-Richter MKS, Fong RH, et al. Broadly
21 Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind an Epitope on E2 and Inhibit Entry and Egress. Cell. 19
22 de novembro de 2015;163(5):1095–107.
- 23 9. Sun S, Xiang Y, Akahata W, Holdaway H, Pal P, Zhang X, et al. Structural analyses at pseudo
24 atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization. Elife.
25 18 de fevereiro de 2013;2013(2).
- 26 10. Basore K, Kim AS, Nelson CA, Zhang R, Smith BK, Uranga C, et al. Cryo-EM Structure of
27 Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. Cell [Internet]. 13 de junho de 2019
28 [citado 3 de abril de 2024];177(7):1725-1737.e16. Disponível em:
29 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31080061/>
- 30 11. Costa LB, Barreto FK de A, Barreto MCA, Santos THP dos, Andrade M de MO de, Farias
31 LABG, et al. Epidemiology and Economic Burden of Chikungunya: A Systematic Literature Review.
32 Trop Med Infect Dis [Internet]. 1º de junho de 2023 [citado 31 de janeiro de 2024];8(6).
33 Disponível em: [/pmc/articles/PMC10302198/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31080061/)
- 34 12. Marimoutou C, Ferraro J, Javelle E, Deparis X, Simon F. Chikungunya infection: self-
35 reported rheumatic morbidity and impaired quality of life persist 6 years later. Clin Microbiol
36 Infect [Internet]. 1º de julho de 2015 [citado 31 de janeiro de 2024];21(7):688–93. Disponível
37 em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25752222/>
- 38 13. Amaral JK, Bilsborrow JB, Schoen RT. Chronic Chikungunya Arthritis and Rheumatoid
39 Arthritis: What They Have in Common. Am J Med [Internet]. 1º de março de 2020 [citado 4 de
40 fevereiro de 2024];133(3):e91–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31705850/>

- 1 14. Zaid A, Gérardin P, Taylor A, Mostafavi H, Malvy D, Mahalingam S. Chikungunya Arthritis:
2 Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. *Arthritis*
3 *Rheumatol* [Internet]. 1º de abril de 2018 [citado 31 de janeiro de 2024];70(4):484–95.
4 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29287308/>
- 5 15. Javelle E, Ribera A, Degasne I, Gaüzère BA, Marimoutou C, Simon F. Specific management
6 of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island
7 from 2006-2012. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 11 de março de 2015 [citado 31 de janeiro de
8 2024];9(3). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25760632/>
- 9 16. Sutaria RB, Amaral JK, Schoen RT. Emergence and treatment of chikungunya arthritis.
10 *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 1º de maio de 2018 [citado 4 de fevereiro de 2024];30(3):256–
11 63. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29389830/>
- 12 17. Abdelnabi R, Neyts J, Delang L. Antiviral Strategies Against Chikungunya Virus. *Methods*
13 *Mol Biol* [Internet]. 28 de maio de 2016 [citado 31 de janeiro de 2024];1426:243–53. Disponível
14 em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27233277/>
- 15 18. Chang AY, Tritsch SR, Porzucek AJ, Schwartz AM, Seyler-Schmidt M, Glass A, et al. A
16 Mouse Model for Studying Post-Acute Arthritis of Chikungunya. *Microorganisms* [Internet]. 1º de
17 setembro de 2021 [citado 29 de janeiro de 2024];9(9). Disponível em:
18 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34576893/>
- 19 19. Amaral JK, Sutaria R, Schoen RT. Treatment of Chronic Chikungunya Arthritis With
20 Methotrexate: A Systematic Review. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 1º de outubro de
21 2018 [citado 1º de fevereiro de 2024];70(10):1501–8. Disponível em:
22 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29361202/>
- 23 20. Alexandre C, De Brito A, Karla A, Von Sohsten A, De Azevedo D, Frutuoso CV.
24 Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline. *Rev Soc Bras Med*
25 *Trop*. 49(6):668–79.
- 26 21. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation.
27 *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(2).
- 28 22. Chiang N, Serhan CN. Structural Elucidation and Physiologic Functions of Specialized Pro-
29 Resolving Mediators and Their Receptors.
- 30 23. Rasquel-Oliveira FS, Silva MDV da, Martelossi-Cebinelli G, Fattori V, Casagrande R, Verri
31 WA. Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators: Endogenous Roles and Pharmacological Activities
32 in Infections. *Molecules* [Internet]. 1º de julho de 2023 [citado 16 de janeiro de 2024];28(13).
33 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37446699/>
- 34 24. Chávez-Castillo M, Ortega Á, Cudris-Torres L, Duran P, Rojas M, Manzano A, et al.
35 Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators: The Future of Chronic Pain Therapy? *Int J Mol Sci*
36 [Internet]. 1º de outubro de 2021 [citado 1º de agosto de 2023];22(19). Disponível em:
37 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34638711/>
- 38 25. Fattori V, Pinho-Ribeiro FA, Staurengo-Ferrari L, Borghi SM, Rossaneis AC, Casagrande R,
39 et al. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a
40 long-lasting analgesic effect. *Br J Pharmacol*. 1º de junho de 2019;176(11):1728–44.

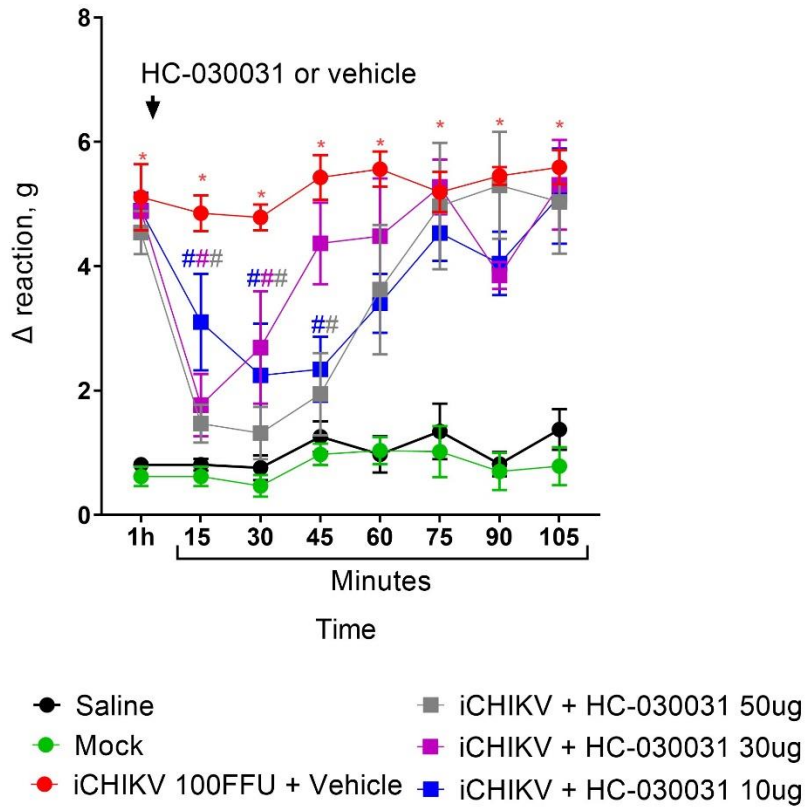
- 1 26. Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate
2 inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med*. 2010;16(5):592–7.
- 3 27. Deng B, Wang CW, Arnardottir HH, Li Y, Cheng CYC, Dalli J, et al. Maresin biosynthesis and
4 identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human
5 macrophages. *PLoS One* [Internet]. 18 de julho de 2014 [citado 16 de janeiro de 2024];9(7).
6 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25036362/>
- 7 28. Abdulnour REE, Dalli J, Colby JK, Krishnamoorthy N, Timmons JY, Tan SH, et al. Maresin 1
8 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. *Proc Natl Acad Sci U S A*
9 [Internet]. 18 de novembro de 2014 [citado 16 de janeiro de 2024];111(46):16526–31.
10 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25369934/>
- 11 29. Ogawa N, Amano T, Kobayashi Y. Synthesis of Optically Active Maresin 2 and Maresin 2
12 n-3 DPA. *Synlett* [Internet]. 12 de fevereiro de 2021 [citado 16 de janeiro de 2024];32(3):295–8.
13 Disponível em: [http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0040-
14 1705959](http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0040-1705959)
- 15 30. Lopes RV, Baggio DF, Ferraz CR, Bertozzi MM, Saraiva-Santos T, Verri Junior WA, et al.
16 Maresin-2 inhibits inflammatory and neuropathic trigeminal pain and reduces neuronal
17 activation in the trigeminal ganglion. *Current research in neurobiology* [Internet]. 1º de janeiro
18 de 2023 [citado 11 de janeiro de 2024];4. Disponível em:
19 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37397816/>
- 20 31. Fattori V, Zaninelli TH, Ferraz CR, Brasil-Silva L, Borghi SM, Cunha JM, et al. Maresin 2 is
21 an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil and
22 monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1 and TRPA1 activation, and CGRP release.
23 *Neuropharmacology*. 15 de setembro de 2022;216.
- 24 32. Segato-Vendrameto CZ, Zanluca C, Zucoloto AZ, Zaninelli TH, Bertozzi MM, Saraiva-
25 Santos T, et al. Chikungunya Virus and Its Envelope Protein E2 Induce Hyperalgesia in Mice:
26 Inhibition by Anti-E2 Monoclonal Antibodies and by Targeting TRPV1. *Cells*. 1º de fevereiro de
27 2023;12(4).
- 28 33. Park CK. Maresin 1 Inhibits TRPV1 in Temporomandibular Joint-Related Trigeminal
29 Nociceptive Neurons and TMJ Inflammation-Induced Synaptic Plasticity in the Trigeminal
30 Nucleus. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
- 31 34. Bartholomeeusen K, Daniel M, LaBeaud DA, Gasque P, Peeling RW, Stephenson KE, et al.
32 Chikungunya fever. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 1º de dezembro de 2023 [citado 26 de julho
33 de 2023];9(1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37024497/>
- 34 35. LaBeaud AD, Bashir F, King CH. Measuring the burden of arboviral diseases: the spectrum
35 of morbidity and mortality from four prevalent infections. *Popul Health Metr* [Internet]. 10 de
36 janeiro de 2011 [citado 9 de janeiro de 2024];9(1). Disponível em:
37 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21219615/>
- 38 36. Teo TH, Chan YH, Lee WWL, Lum FM, Amrun SN, Her Z, et al. Fingolimod treatment
39 abrogates chikungunya virus-induced arthralgia. *Sci Transl Med* [Internet]. 1º de fevereiro de
40 2017 [citado 11 de setembro de 2023];9(375). Disponível em:
41 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28148838/>

- 1 37. Zygmunt PM, Högesätt ED. TRPA1. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2014 [citado 20 de
2 dezembro de 2023];222:583–630. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24756722/>
- 3 38. Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, et al. A role of TRPA1 in
4 mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain*. 17 de dezembro de
5 2007;3.
- 6 39. Cheng JK, Ji RR. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain.
7 *Neurochem Res* [Internet]. outubro de 2008 [citado 11 de janeiro de 2024];33(10):1970–8.
8 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18427980/>
- 9 40. Miyakawa T, Terashima Y, Takebayashi T, Tanimoto K, lwase T, Ogon I, et al. Transient
10 receptor potential ankyrin 1 in spinal cord dorsal horn is involved in neuropathic pain in nerve
11 root constriction rats. *Mol Pain*. 6 de setembro de 2014;10(1).
- 12 41. Diogenes A, Ferraz CCR, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM. LPS sensitizes TRPV1
13 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res* [Internet]. junho de 2011 [citado
14 19 de dezembro de 2023];90(6):759–64. Disponível em:
15 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21393555/>
- 16 42. Sanjai Kumar P, Nayak TK, Mahish C, Sahoo SS, Radhakrishnan A, De S, et al. Inhibition of
17 transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel regulates chikungunya virus infection in
18 macrophages. *Arch Virol* [Internet]. 1º de janeiro de 2021 [citado 19 de dezembro de
19 2023];166(1):139–55. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33125586/>
- 20 43. Gutierrez H, Davies AM. Regulation of neural process growth, elaboration and structural
21 plasticity by NF-κB. *Trends Neurosci*. 1º de junho de 2011;34(6):316–25.
- 22 44. Álvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, et al. The
23 p65 subunit of NF-κB binds to PGC-1α, linking inflammation and metabolic disturbances in
24 cardiac cells. *Cardiovasc Res* [Internet]. 1º de agosto de 2010 [citado 16 de outubro de
25 2023];87(3):449–58. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvq080>
- 26 45. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target*
27 *Ther* [Internet]. 2017 [citado 19 de dezembro de 2023];2. Disponível em:
28 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29158945/>
- 29 46. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb*
30 *Perspect Biol* [Internet]. 2009 [citado 19 de dezembro de 2023];1(6). Disponível em:
31 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20457564/>
- 32 47. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF-κB: A Blossoming of Relevance to
33 Human Pathobiology. *Cell* [Internet]. 12 de janeiro de 2017 [citado 20 de dezembro de
34 2023];168(1–2):37–57. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28086098/>
- 35 48. Fernandes ES, Liang L, Smillie SJ, Kaiser F, Purcell R, Rivett DW, et al. TRPV1 deletion
36 enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response
37 syndrome. *J Immunol* [Internet]. 1º de junho de 2012 [citado 19 de dezembro de
38 2023];188(11):5741–51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22547700/>
- 39 49. Hatano N, Itoh Y, Suzuki H, Muraki Y, Hayashi H, Onozaki K, et al. Hypoxia-inducible
40 Factor-1α (HIF1α) Switches on Transient Receptor Potential Ankyrin Repeat 1 (TRPA1) Gene
41 Expression via a Hypoxia Response Element-like Motif to Modulate Cytokine Release. *J Biol Chem*

- 1 [Internet]. 9 de setembro de 2012 [citado 19 de dezembro de 2023];287(38):31962. Disponível
2 em: /pmc/articles/PMC3442528/
- 3 50. Luostarinen S, Hämäläinen M, Moilanen E. Transient Receptor Potential Ankyrin 1
4 (TRPA1)—An Inflammation-Induced Factor in Human HaCaT Keratinocytes. *Int J Mol Sci*
5 [Internet]. 1º de abril de 2021 [citado 19 de dezembro de 2023];22(7). Disponível em:
6 /pmc/articles/PMC8037497/
- 7 51. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the
8 crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014
9 [citado 20 de dezembro de 2023];1843(11):2563–82. Disponível em:
10 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24892271/>
- 11 52. Wilzopolski J, Kietzmann M, Mishra SK, Stark H, Bäumer W, Roszbach K. Trpv1 and trpa1
12 channels are both involved downstream of histamine-induced itch. *Biomolecules*. 1º de agosto
13 de 2021;11(8).
- 14 53. Dhand A, Aminoff MJ. The neurology of itch. *Brain* [Internet]. 2014 [citado 7 de dezembro
15 de 2023];137(Pt 2):313–22. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23794605/>
- 16 54. Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, et al. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-
17 butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1
18 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. abril de
19 2005 [citado 11 de janeiro de 2024];313(1):474–84. Disponível em:
20 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15615864/>
- 21 55. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev*
22 *Immunol* [Internet]. agosto de 2013 [citado 20 de dezembro de 2023];13(9):679–92. Disponível
23 em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23954936/>

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

1 **Supplementary Figure 1**



2

3 **Supplementary Figure 1: HC-030031, a TRPA1 antagonist, reduces mechanical**
 4 **hyperalgesia induced by iCHIKV.** Mice received intra-articular (i.a.) injection of iCHIKV
 5 (100 FFU, 10 μ L saline) or Mock (negative control, 10 μ L), and were treated intrathecally
 6 with HC-030031 (10 μ g, 30 μ g and 50 μ g). The mechanical hyperalgesia was evaluated for
 7 a total fo 105 minutes with an interval of 15 minutes between each measure. Results are
 8 presented as the mean \pm SEM of six mice per group per experiment. * p < 0.05 compared
 9 to Mock group; ANOVA followed by Tukey's test.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

5. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foi demonstrado que, juntamente com o canal TRPV1, o canal TRPA1 também atua no processo nociceptivo durante infecção causada pelo CHIKV e rE2. A hiperalgesia induzida pode ser minimizada com o uso do mediador lipídico Maresina 2, tendo demonstrado o seu papel analgésico na dor aguda, quando tratada pela via de administração i.t.

O tratamento pela por esta via permite que o mediador atue de forma mais direta nos canais TRPV1 e TRPA1, localizados nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, como já descrito na literatura, levando ao bloqueio da transmissão do estímulo doloroso para a via ascendente, inibindo a percepção de dor e, conseqüentemente, a sensibilização que levaria à hiperalgesia.

Como observado em nossos resultados, o estímulo por Chikungunya inativado ou pela proteína recombinante E2, geram hiperalgesia, ao menos em parte, pela modulação dos canais TRPV1 e TRPA1, enquanto o mediador lipídico pró-resolutivo Maresina 2 é capaz de induzir a analgesia ao inibir a ativação desses canais.

Em conclusão, somando todos os fatores supracitados, a capacidade analgésica promovida pela MaR2 através da administração intratecal, proporciona analgesia satisfatória em doses baixas, na faixa dos nanogramas, fato que, somado à produção endógena deste mediador e ausência de efeitos adversos descritos, contribuem para seu potencial como analgésico efetivo e seguro.

1 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 2 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Básica: Funções e distúrbios do sistema**
3 **imunológico**. [s.l.] Saunders Elsevier, 2014. v. 4539 p.
- 4 ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Antiviral Strategies Against Chikungunya Virus. **Methods**
5 **in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1426, p. 243–253, 28 maio 2016. Disponível em:
6 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27233277/>>. Acesso em: 31 jan. 2024.
- 7 ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; HEZMEE,
8 M. N. M. **The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review****Veterinary**
9 **World****Veterinary World**, 15 maio 2018.
- 10 AGARWAL, A.; SHARMA, A. K.; SUKUMARAN, D.; PARIDA, M.; DASH, P. K. Two novel epistatic
11 mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness
12 in *Aedes aegypti*. **Virology**, v. 497, p. 59–68, 1 out. 2016.
- 13 ALTHOUSE, B. M.; GUERBOIS, M.; CUMMINGS, D. A. T.; DIOP, O. M.; FAYE, O.; FAYE, A.; DIALLO,
14 D.; SADIO, B. D.; SOW, A.; FAYE, O.; SALL, A. A.; DIALLO, M.; BENEFIT, B.; SIMONS, E.; WATTS, D.
15 M.; WEAVER, S. C.; HANLEY, K. A. Role of monkeys in the sylvatic cycle of chikungunya virus in
16 Senegal. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.
- 17 AMARAL, J. K.; BILSBORROW, J. B.; SCHOEN, R. T. Chronic Chikungunya Arthritis and Rheumatoid
18 Arthritis: What They Have in Common. **The American journal of medicine**, v. 133, n. 3, p. e91–
19 e97, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31705850/>>. Acesso em: 4
20 fev. 2024.
- 21 AMARAL, J. K.; BINGHAM, C. O.; SCHOEN, R. T. Successful Methotrexate Treatment of Chronic
22 Chikungunya Arthritis. **Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic &**
23 **musculoskeletal diseases**, v. 26, n. 3, p. 119–124, 1 abr. 2020. Disponível em:
24 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30520824/>>. Acesso em: 31 jan. 2024.
- 25 AMARAL, J. K.; BINGHAM, C. O.; TAYLOR, P. C.; VILÁ, L. M.; WEINBLATT, M. E.; SCHOEN, R. T.
26 Pathogenesis of chronic chikungunya arthritis: Resemblances and links with rheumatoid arthritis.
27 **Travel medicine and infectious disease**, v. 52, 1 mar. 2023. Disponível em:
28 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36549417/>>. Acesso em: 29 jan. 2024.
- 29 AMARAL, J. K.; SUTARIA, R.; SCHOEN, R. T. Treatment of Chronic Chikungunya Arthritis With
30 Methotrexate: A Systematic Review. **Arthritis care & research**, v. 70, n. 10, p. 1501–1508, 1 out.
31 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29361202/>>. Acesso em: 1 fev. 2024.
- 32 AMAYA, F.; DECOSTERD, I.; SAMAD, T. A.; PLUMPTON, C.; TATE, S.; MANNION, R. J.; COSTIGAN,
33 M.; WOOLF, C. J. Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-
34 gated sodium ion channels SNS and SNS2. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 15, n. 4, p.
35 331–342, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10845770/>>. Acesso em: 18
36 out. 2023.
- 37 AMAYA, F.; IZUMI, Y.; MATSUDA, M.; SASAKI, M. Tissue Injury and Related Mediators of Pain
38 Exacerbation. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 6, p. 592, 8 nov. 2013. Disponível em:
39 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/243849785/>>. Acesso em: 18 out. 2023.
- 40 AMAYA, F.; OH-HASHI, K.; NARUSE, Y.; IJIMA, N.; UEDA, M.; SHIMOSATO, G.; TOMINAGA, M.;
41 TANAKA, Y.; TANAKA, M. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within

1 distinct subgroups of DRG neurons. **Brain Research**, v. 963, n. 1–2, p. 190–196, 14 fev. 2003.
2 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12560124/>>. Acesso em: 18 out. 2023.

3 AMAYA, F.; SHIMOSATO, G.; NAGANO, M.; UEDA, M.; HASHIMOTO, S.; TANAKA, Y.; SUZUKI, H.;
4 TANAKA, M. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to
5 development of inflammatory thermal hyperalgesia. **The European journal of neuroscience**, v.
6 20, n. 9, p. 2303–2310, nov. 2004. Disponível em:
7 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15525272/>>. Acesso em: 18 out. 2023.

8 AYDEDE, M.; SHRIVER, A. Recently introduced definition of “nociceptive pain” by the International
9 Association for the Study of Pain needs better formulation. **Pain**, v. 159, n. 6, p. 1176–1177, 1
10 jun. 2018. Disponível em:
11 <[https://journals.lww.com/pain/fulltext/2018/06000/recently_introduced_definition_of_noci
12 plastic.22.aspx](https://journals.lww.com/pain/fulltext/2018/06000/recently_introduced_definition_of_nociceptive_pain.22.aspx)>. Acesso em: 18 out. 2023.

13 BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms
14 of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 16 out. 2009. Disponível em:
15 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19837031/>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

16 BASORE, K.; KIM, A. S.; NELSON, C. A.; ZHANG, R.; SMITH, B. K.; URANGA, C.; VANG, L.; CHENG,
17 M.; GROSS, M. L.; SMITH, J.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Cryo-EM Structure of Chikungunya
18 Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1725–1737.e16, 13 jun. 2019.

19 BAUTISTA, D. M.; JORDT, S. E.; NIKAI, T.; TSURUDA, P. R.; READ, A. J.; POBLETE, J.; YAMOAH, E. N.;
20 BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants
21 and proalgesic agents. **Cell**, v. 124, n. 6, p. 1269–1282, 24 mar. 2006. Disponível em:
22 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16564016/>>. Acesso em: 20 dez. 2023.

23 BENJAMANUKUL, S.; OSIRI, M.; CHANSAENROJ, J.; CHIRATHAWORN, C.; POOVORAWAN, Y.
24 Rheumatic manifestations of Chikungunya virus infection: Prevalence, patterns, and enthesitis.
25 **PLoS ONE**, v. 16, n. 4 April 2021, 1 abr. 2021. . Acesso em: 31 jan. 2024.

26 BERTIN, S.; AOKI-NONAKA, Y.; DE JONG, P. R.; NOHARA, L. L.; XU, H.; STANWOOD, S. R.; SRIKANTH,
27 S.; LEE, J.; TO, K.; ABRAMSON, L.; YU, T.; HAN, T.; TOUMA, R.; LI, X.; GONZÁLEZ-NAVAJAS, J. M.;
28 HERDMAN, S.; CORR, M.; FU, G.; DONG, H.; GWACK, Y.; FRANCO, A.; JEFFERIES, W. A.; RAZ, E. The
29 ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4+ T cells.
30 **Nature Immunology** 2014 15:11, v. 15, n. 11, p. 1055–1063, 5 out. 2014. Disponível em:
31 <<https://www.nature.com/articles/ni.3009>>. Acesso em: 16 out. 2023.

32 BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of**
33 **leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2007. Disponível em:
34 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17032697/>>. Acesso em: 18 out. 2023.

35 BORGHERINI, G.; POUBEAU, P.; JOSSAUME, A.; GOUIX, A.; COTTE, L.; MICHAULT, A.; ARVIN-
36 BEROD, C.; PAGANIN, F. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88
37 adult patients on reunion island. **Clinical infectious diseases : an official publication of the**
38 **Infectious Diseases Society of America**, v. 47, n. 4, p. 469–475, 15 ago. 2008. Disponível em:
39 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18611153/>>. Acesso em: 4 fev. 2024.

40 BOUQUILLARD, É.; COMBE, B. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya
41 fever. A mean follow-up of two years. **Joint bone spine**, v. 76, n. 6, p. 654–657, dez. 2009.
42 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945329/>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

- 1 BURT, F. J.; CHEN, W.; MINER, J. J.; LENSCHOW, D. J.; MERITS, A.; SCHNETTLER, E.; KOHL, A.; RUDD,
2 P. A.; TAYLOR, A.; HERRERO, L. J.; ZAID, A.; NG, L. F. P.; MAHALINGAM, S. **Chikungunya virus: an**
3 **update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen***The Lancet Infectious*
4 **Diseases**Lancet Publishing Group, 1 abr. 2017.
- 5 CAGLIOTI, C.; LALLE, E.; CASTILLETI, C.; CARLETTI, F.; CAPOBIANCHI, M. R.; BORDI, L.
6 **Chikungunya virus infection: an overview***NEW MICROBIOLOGICA*. [s.l: s.n.]. Disponível em:
7 <<http://www.cdc.gov/chikungunya/map/index.html>>.
- 8 CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukotrienes and**
9 **Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 3, p. 197–202, 2006.
- 10 CAVANAUGH, D. J.; LEE, H.; LO, L.; SHIELDS, S. D.; ZYLKA, M. J.; BASBAUM, A. I.; ANDERSON, D. J.
11 Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious
12 thermal and mechanical stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**
13 **States of America**, v. 106, n. 22, p. 9075–9080, 2 jun. 2009. Disponível em:
14 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451647/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- 15 CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. **Inflammatory**
16 **responses and inflammation-associated diseases in organs***Oncotarget*. [s.l: s.n.]. Disponível em:
17 <www.impactjournals.com/oncotarget/>.
- 18 CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain.
19 **Neurochemical research**, v. 33, n. 10, p. 1970–1978, out. 2008. Disponível em:
20 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18427980/>>. Acesso em: 11 jan. 2024.
- 21 CHIANG, N.; FREDMAN, G.; BÄCKHED, F.; OH, S. F.; VICKERY, T.; SCHMIDT, B. A.; SERHAN, C. N.
22 Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. **Nature**, v. 484,
23 n. 7395, p. 524–528, 2012.
- 24 CHIRATHAWORN, C.; CHANSAENROJ, J.; POOVORAWAN, Y. **Cytokines and chemokines in**
25 **chikungunya virus infection: Protection or induction of pathology***Pathogens*MDPI AG, 1 jun.
26 2020.
- 27 CHIU, I. M.; VON HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous
28 system in host defense and immunopathology. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1063–1067,
29 ago. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22837035/>>. Acesso em: 18 out.
30 2023.
- 31 CHO, B.; JEON, B. Y.; KIM, J.; NOH, J.; KIM, J.; PARK, M.; PARK, S. Expression and evaluation of
32 Chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of chikungunya virus infection.
33 **Yonsei Medical Journal**, v. 49, n. 5, p. 828–835, 2008.
- 34 COHEN, M.; QUINTNER, J.; VAN RYSEWYK, S. Reconsidering the International Association for the
35 study of pain definition of pain. **Pain Reports**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2018.
- 36 COHEN, S. P.; VASE, L.; HOOTEN, W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and
37 new advances. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10289, p. 2082–2097, 29 maio 2021.
38 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34062143/>>. Acesso em: 31 mar. 2024.
- 39 CONSTANT, L. E. C.; RAJSFUS, B. F.; CARNEIRO, P. H.; SISNANDE, T.; MOHANA-BORGES, R.;
40 ALLONSO, D. **Overview on Chikungunya Virus Infection: From Epidemiology to State-of-the-Art**
41 **Experimental Models***Frontiers in Microbiology*Frontiers Media S.A., 5 out. 2021.

- 1 CONSTANTIN, C. E.; MAIR, N.; SAILER, C. A.; ANDRATSCH, M.; XU, Z. Z.; BLUMER, M. J. F.;
2 SCHERBAKOV, N.; DAVIS, J. B.; BLUETHMANN, H.; JI, R. R.; KRESS, M. Endogenous tumor necrosis
3 factor α (TNF α) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer
4 model. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 19, p. 5072–5081, 2008.
- 5 COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the
6 Nervous System to Damage. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>, v. 32, p.
7 1–32, 25 jun. 2009. Disponível em:
8 <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>>. Acesso
9 em: 18 out. 2023.
- 10 COUDERC, T.; CHRÉTIEN, F.; SCHILTE, C.; DISSON, O.; BRIGITTE, M.; GUIVEL-BENHASSINE, F.;
11 TOURET, Y.; BARAU, G.; CAYET, N.; SCHUFFENECKER, I.; DESPRÈS, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.;
12 MICHAULT, A.; ALBERT, M. L.; LECUIT, M. A mouse model for Chikungunya: young age and
13 inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS pathogens**, v. 4, n.
14 2, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18282093/>>. Acesso em: 31 jan.
15 2024.
- 16 CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. **A cascade of**
17 **cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice**. [s.l.: s.n.]. Disponível
18 em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409225102>.
- 19 DA CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review.
20 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, 2017. Disponível em:
21 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28767976/>>. Acesso em: 20 dez. 2023.
- 22 DENG, B.; WANG, C. W.; ARNARDOTTIR, H. H.; LI, Y.; CHENG, C. Y. C.; DALLI, J.; SERHAN, C. N.
23 Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving
24 mediator from human macrophages. **PLoS one**, v. 9, n. 7, 18 jul. 2014. Disponível em:
25 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25036362/>>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- 26 DOLY, S.; FISCHER, J.; SALIO, C.; CONRATH, M. The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal
27 dorsal horn astrocytes. **Neuroscience Letters**, v. 357, n. 2, p. 123–126, 4 mar. 2004. Disponível
28 em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15036590/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- 29 DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of**
30 **Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 1 nov. 2010. Disponível em:
31 <<http://www.jci.org>>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- 32 EDWARDS, J. G. TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and
33 pharmacological implications. **Progress in drug research. Fortschritte der**
34 **Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques**, v. 68, p. 77–104, 2014.
35 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24941665/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- 36 FATTORI, V.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STAURENGO-FERRARI, L.; BORGHI, S. M.; ROSSANEIS, A. C.;
37 CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces
38 inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. **British Journal of Pharmacology**, v. 176,
39 n. 11, p. 1728–1744, 1 jun. 2019.
- 40 FATTORI, V.; ZANINELLI, T. H.; FERRAZ, C. R.; BRASIL-SILVA, L.; BORGHI, S. M.; CUNHA, J. M.;
41 CHICHORRO, J. G.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Maresin 2 is an analgesic specialized pro-
42 resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil and monocyte recruitment, nociceptor

- 1 neuron TRPV1 and TRPA1 activation, and CGRP release. **Neuropharmacology**, v. 216, 15 set.
2 2022.
- 3 FERRAZ, C. R.; CALIXTO-CAMPOS, C.; MANCHOPE, M. F.; CASAGRANDE, R.; CLISSA, P. B.; BALDO,
4 C.; VERRI, W. A. Jararhagin-induced mechanical hyperalgesia depends on TNF- α , IL-1 β and NF κ B
5 in mice. **Toxicon**, v. 103, p. 119–128, 2015.
- 6 FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia Geral**. [s.l: s.n.]v. 6328 p.
- 7 FINNERUP, N. B.; KUNER, R.; JENSEN, T. S. Neuropathic pain: From mechanisms to treatment.
8 **Physiological Reviews**, v. 101, n. 1, p. 259–301, 1 jan. 2021.
- 9 FISCHER, M. J. M.; BALASURIYA, D.; JEGGLE, P.; GOETZE, T. A.; MCNAUGHTON, P. A.; REEH, P. W.;
10 EDWARDSON, J. M. Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. **Pflugers Archiv**
11 **European Journal of Physiology**, v. 466, n. 12, p. 2229–2241, 18 nov. 2014.
- 12 FOX, J. M.; DIAMOND, M. S. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya
13 Virus. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 197, n. 11, p. 4210–4218, 1 dez. 2016.
14 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27864552/>>. Acesso em: 13 set. 2023.
- 15 FOX, J. M.; LONG, F.; EDELING, M. A.; LIN, H.; VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S.; FONG, R. H.; KAHLE,
16 K. M.; SMIT, J. M.; JIN, J.; SIMMONS, G.; DORANZ, B. J.; CROWE, J. E.; FREMONT, D. H.;
17 ROSSMANN, M. G.; DIAMOND, M. S. Broadly Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind an Epitope
18 on E2 and Inhibit Entry and Egress. **Cell**, v. 163, n. 5, p. 1095–1107, 19 nov. 2015.
- 19 GARDNER, J.; ANRAKU, I.; LE, T. T.; LARCHER, T.; MAJOR, L.; ROQUES, P.; SCHRODER, W. A.; HIGGS,
20 S.; SUHRBIER, A. Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. **Journal of Virology**, v. 84,
21 n. 16, p. 8021–8032, 15 ago. 2010.
- 22 GAVVA, N. R.; TAMIR, R.; QU, Y.; KLIONSKY, L.; ZHANG, T. J.; IMMKE, D.; WANG, J.; ZHU, D.;
23 VANDERAH, T. W.; PORRECA, F.; DOHERTY, E. M.; NORMAN, M. H.; WILD, K. D.; BANNON, A. W.;
24 LOUIS, J. C.; TREANOR, J. J. S. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]
25 dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic
26 properties. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 474–
27 484, abr. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15615864/>>. Acesso em: 11
28 jan. 2024.
- 29 GEES, M.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B.; VOETS, T. **TRP channels** **Comprehensive Physiology** jan. 2012.
- 30 GHASEMLOU, N.; CHIU, I. M.; JULIEN, J. P.; WOOLF, C. J. CD11b+Ly6G- myeloid cells mediate
31 mechanical inflammatory pain hypersensitivity. **Proceedings of the National Academy of**
32 **Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 49, p. E6808–E6817, 8 dez. 2015. Disponível
33 em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1501372112>>. Acesso em: 28 out. 2023.
- 34 GIERA, M.; IOAN-FACSINAY, A.; TOES, R.; GAO, F.; DALLI, J.; DEELDER, A. M.; SERHAN, C. N.;
35 MAYBORODA, O. A. Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid
36 arthritis patients by means of LC-MS/MS. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell**
37 **Biology of Lipids**, v. 1821, n. 11, p. 1415–1424, nov. 2012.
- 38 GOUPIL, B. A.; MCNULTY, M. A.; MARTIN, M. J.; MCCRACKEN, M. K.; CHRISTOFFERSON, R. C.;
39 MORES, C. N. Novel Lesions of Bones and Joints Associated with Chikungunya Virus Infection in
40 Two Mouse Models of Disease: New Insights into Disease Pathogenesis. **PLoS one**, v. 11, n. 5, 1

1 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27182740/>>. Acesso em: 31 jan.
2 2024.

3 GÜDES, S.; BARKAI, O.; CASPI, Y.; KATZ, B.; LEV, S.; BINSHTOK, A. M. The role of slow and persistent
4 TTX-resistant sodium currents in acute tumor necrosis factor-mediated increase in nociceptors
5 excitability. **Dubin and Patapoutian**, v. 113, p. 601–619, 2015. Disponível em: <www.jn.org>.

6 HAANPÄÄ, M.; ATTAL, N.; BACKONJA, M.; BARON, R.; BENNETT, M.; BOUHASSIRA, D.; CRUCCU,
7 G.; HANSSON, P.; HAYTHORNTHWAITE, J. A.; IANNETTI, G. D.; JENSEN, T. S.; KAUPPILA, T.;
8 NURMIKKO, T. J.; RICE, A. S. C.; ROWBOTHAM, M.; SERRA, J.; SOMMER, C.; SMITH, B. H.; TREEDE,
9 R. D. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 14–27, jan. 2011.
10 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20851519/>>. Acesso em: 6 nov. 2023.

11 HAN, S. W.; JUNG, Y. K.; LEE, E. J.; PARK, H. R.; KIM, G. W.; JEONG, J. H.; HAN, M. S.; CHOI, J. Y.
12 DICAM inhibits angiogenesis via suppression of AKT and p38 MAP kinase signalling.
13 **Cardiovascular research**, v. 98, n. 1, p. 73–82, 1 abr. 2013. Disponível em:
14 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23386276/>>. Acesso em: 6 fev. 2024.

15 HOARAU, J.-J.; JAFFAR BANDJEE, M.-C.; KREJBICH TROTOT, P.; DAS, T.; LI-PAT-YUEN, G.; DASSA, B.;
16 DENIZOT, M.; GUICHARD, E.; RIBERA, A.; HENNI, T.; TALLET, F.; MOITON, M. P.; GAUZÈRE, B. A.;
17 BRUNIQUET, S.; JAFFAR BANDJEE, Z.; MORBIDELLI, P.; MARTIGNY, G.; JOLIVET, M.; GAY, F.;
18 GRANDADAM, M.; TOLOU, H.; VIEILLARD, V.; DEBRÉ, P.; AUTRAN, B.; GASQUE, P. Persistent
19 chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust
20 host immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 10, p. 5914–
21 5927, 15 maio 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20404278/>>. Acesso
22 em: 31 jan. 2024.

23 HONG, S.; GRONERT, K.; DEVCHAND, P. R.; MOUSSIGNAC, R. L.; SERHAN, C. N. Novel
24 docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human
25 blood, and glial cells: Autacoids in anti-inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.
26 17, p. 14677–14687, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M300218200>>.

27 HUANG, D.; LI, S.; DHAKA, A.; STORY, G. M.; CAO, Y. Q. Expression of the transient receptor
28 potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons
29 innervating the dura. **Molecular pain**, v. 8, 12 set. 2012. Disponível em:
30 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22971321/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

31 HWANG, S. J.; MIN OH, J.; VALTSCHANOFF, J. G. Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat
32 dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous
33 afferents. **Brain research**, v. 1047, n. 2, p. 261–266, 21 jun. 2005. Disponível em:
34 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15896726/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

35 JANEWAY, J.; MEDZHITOV, R. Introduction: The role of innate immunity in the adaptive immune
36 response. **Seminars in Immunology**, v. 10, n. 5, p. 349–350, 1998. Disponível em:
37 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9799708/>>. Acesso em: 18 out. 2023.

38 JAVELLE, E.; RIBERA, A.; DEGASNE, I.; GAUZÈRE, B. A.; MARIMOUTOU, C.; SIMON, F. Specific
39 management of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159 cases in
40 Reunion Island from 2006-2012. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, 11 mar. 2015.
41 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25760632/>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

1 JI, R. R.; SAMAD, T. A.; JIN, S. X.; SCHMOLL, R.; WOOLF, C. J. p38 MAPK activation by NGF in
2 primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat
3 hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57–68, 26 set. 2002. Disponível em:
4 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12367506/>>. Acesso em: 18 out. 2023.

5 JI, R. R.; XU, Z. Z.; STRICHARTZ, G.; SERHAN, C. N. Emerging roles of resolvins in the resolution of
6 inflammation and pain. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 11, p. 599–609, 2011. Disponível em:
7 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2011.08.005>>.

8 JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 29, p.
9 355–384, out. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24099085/>>. Acesso em:
10 18 out. 2023.

11 JUNG, Y. K.; HAN, S. W.; KIM, G. W.; JEONG, J. H.; KIM, H. J.; CHOI, J. Y. DICAM inhibits osteoclast
12 differentiation through attenuation of the integrin $\alpha V\beta 3$ pathway. **Journal of bone and mineral**
13 **research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 27, n.
14 9, p. 2024–2034, set. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22492581/>>.
15 Acesso em: 6 fev. 2024.

16 JUNG, Y. K.; JIN, J. S.; JEONG, J. H.; KIM, H. N.; PARK, N. R.; CHOI, J. Y. DICAM, a novel dual
17 immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule interacts with $\alpha V\beta 3$ integrin.
18 **Journal of cellular physiology**, v. 216, n. 3, p. 603–614, set. 2008. Disponível em:
19 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18366072/>>. Acesso em: 6 fev. 2024.

20 KARASHIMA, Y.; DAMANN, N.; PRENEN, J.; TALAVERA, K.; SEGAL, A.; VOETS, T.; NILIUS, B. Bimodal
21 action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. **Journal of Neuroscience**,
22 v. 27, n. 37, p. 9874–9884, 12 set. 2007.

23 KENNEDY AMARAL PEREIRA, J.; SCHOEN, R. T. Management of chikungunya arthritis. **Clinical**
24 **rheumatology**, v. 36, n. 10, p. 2179–2186, 1 out. 2017. Disponível em:
25 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28776302/>>. Acesso em: 29 jan. 2024.

26 KHONGWICHIT, S.; CHANSAENROJ, J.; CHIRATHAWORN, C.; POOVORAWAN, Y. Chikungunya virus
27 infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. **Journal**
28 **of Biomedical Science**, v. 28, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2021. Disponível em:
29 <<https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-021-00778-8>>. Acesso em: 6
30 dez. 2023.

31 KOBAYASHI, K.; FUKUOKA, T.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; DAI, Y.; TOKUNAGA, A.; NOGUCHI, K.
32 Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with
33 $A\delta/C$ -fibers and colocalization with Trk receptors. **Journal of Comparative Neurology**, v. 493, n.
34 4, p. 596–606, 26 dez. 2005.

35 KWAN, K. Y.; ALLCHORNE, A. J.; VOLLRATH, M. A.; CHRISTENSEN, A. P.; ZHANG, D. S.; WOOLF, C.
36 J.; COREY, D. P. TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not
37 Essential for Hair-Cell Transduction. **Neuron**, v. 50, n. 2, p. 277–289, 20 abr. 2006.

38 LARSSON, S. C.; KUMLIN, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; WOLK, A. Dietary long-chain n-3 fatty
39 acids for the prevention of cancer: A review of potential mechanisms. **American Journal of**
40 **Clinical Nutrition**, v. 79, n. 6, p. 935–945, 2004.

1 LEE, R. C. H.; HAPUARACHCHI, H. C.; CHEN, K. C.; HUSSAIN, K. M.; CHEN, H.; LOW, S. L.; NG, L. C.;
2 LIN, R.; NG, M. M. L.; CHU, J. J. H. Mosquito Cellular Factors and Functions in Mediating the
3 Infectious entry of Chikungunya Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, 2013.

4 LEVY, B. D.; CLISH, C. B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. **Lipid mediator class switching**
5 **during acute inflammation: signals in resolution.** [s.l.: s.n.]. Disponível em:
6 <<http://immunol.nature.com>>.

7 LOPES, R. V.; BAGGIO, D. F.; FERRAZ, C. R.; BERTOZZI, M. M.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JUNIOR,
8 W. A.; CHICHORRO, J. G. Maresin-2 inhibits inflammatory and neuropathic trigeminal pain and
9 reduces neuronal activation in the trigeminal ganglion. **Current research in neurobiology**, v. 4, 1
10 jan. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37397816/>>. Acesso em: 11 jan.
11 2024.

12 LUOSTARINEN, S.; HÄMÄLÄINEN, M.; MOILANEN, E. Transient Receptor Potential Ankyrin 1
13 (TRPA1)—An Inflammation-Induced Factor in Human HaCaT Keratinocytes. **International Journal**
14 **of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, 1 abr. 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC8037497/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37397816/)>.
15 Acesso em: 19 dez. 2023.

16 MAJHI, R. K.; SAHOO, S. S.; YADAV, M.; PRATHEEK, B. M.; CHATTOPADHYAY, S.; GOSWAMI, C.
17 Functional expression of TRPV channels in T cells and their implications in immune regulation.
18 **The FEBS journal**, v. 282, n. 14, p. 2661–2681, 1 jul. 2015. Disponível em:
19 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25903376/>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

20 MARIMOUTOU, C.; FERRARO, J.; JAVELLE, E.; DEPARIS, X.; SIMON, F. Chikungunya infection: self-
21 reported rheumatic morbidity and impaired quality of life persist 6 years later. **Clinical**
22 **microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical**
23 **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 7, p. 688–693, 1 jul. 2015. Disponível em:
24 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25752222/>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

25 MARKS, M.; MARKS, J. L. Viral arthritis. **Clinical medicine (London, England)**, v. 16, n. 2, p. 129–
26 134, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27037381/>>. Acesso em: 1
27 fev. 2024.

28 MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and
29 neuroinflammation in pain. **Journal of anesthesia**, v. 33, n. 1, p. 131–139, 20 fev. 2019. Disponível
30 em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30448975/>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

31 MATZINGER, P. An innate sense of danger. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 961,
32 p. 341–342, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12081934/>>. Acesso em:
33 18 out. 2023.

34 MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO,
35 M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M.; DESIGNED, C. M.
36 F.; PERFORMED, M. Z. **TRPA1 mediates formalin-induced pain** **PNAS August**. [s.l.: s.n.]. Disponível
37 em:
38 <www.pnas.org/cgi/content/full/0705924104/DC1.www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.07059241
39 04>.

40 MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation** **Nature** Nature Publishing Group,
41 24 jul. 2008.

- 1 MIRANDA, J.; BRAZIL, J. C.; MORRIS, A. H.; PARKOS, C. A.; QUIROS, M.; NUSRAT, A. Maresin-2
2 promotes mucosal repair and has therapeutic potential when encapsulated in thermostable
3 nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
4 **America**, v. 120, n. 4, 24 jan. 2023.
- 5 MOORE, C.; GUPTA, R.; JORDT, S. E.; CHEN, Y.; LIEDTKE, W. B. Regulation of Pain and Itch by TRP
6 Channels. **Neuroscience Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 120, 1 fev. 2018. Disponível em:
7 </pmc/articles/PMC5799130/>. Acesso em: 6 dez. 2023.
- 8 MORALES-LÁZARO, S. L.; LLORENTE, I.; SIERRA-RAMÍREZ, F.; LÓPEZ-ROMERO, A. E.; ORTÍZ-
9 RENTERÍA, M.; SERRANO-FLORES, B.; SIMON, S. A.; ISLAS, L. D.; ROSENBAUM, T. Inhibition of
10 TRPV1 channels by a naturally occurring omega-9 fatty acid reduces pain and itch. **Nature**
11 **communications**, v. 7, 10 out. 2016. Disponível em:
12 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27721373/>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- 13 MOREIRA, T. P.; SOUSA, C. D. F. de; MELO COSTA, V. R. de; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; SANTOS, F.
14 M.; BONILHA, C. S.; ÉSPER, L. M.; NOGUEIRA, M. L.; CUNHA, T. M.; TEIXEIRA, M. M.; COSTA, V. V.;
15 DE SOUZA, D. da G. Tumour necrosis factor plays a deleterious role in the pathogenesis of
16 chikungunya virus infection. **Immunology**, v. 168, n. 3, p. 444–458, 1 mar. 2023. Disponível em:
17 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36164989/>. Acesso em: 9 jan. 2024.
- 18 MORRISON, T. E.; OKO, L.; MONTGOMERY, S. A.; WHITMORE, A. C.; LOTSTEIN, A. R.; GUNN, B.
19 M.; ELMORE, S. A.; HEISE, M. T. A Mouse Model of Chikungunya Virus–Induced Musculoskeletal
20 Inflammatory Disease: Evidence of Arthritis, Tenosynovitis, Myositis, and Persistence. **The**
21 **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 1, p. 32, 2011. Disponível em:
22 </pmc/articles/PMC3069999/>. Acesso em: 31 jan. 2024.
- 23 MÜLLER-LADNER, U.; PAP, T.; GAY, R. E.; NEIDHART, M.; GAY, S. **Mechanisms of disease: the**
24 **molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis.Nature clinical**
25 **practice. Rheumatology**2005.
- 26 NORDGREN, T. M.; HEIRES, A. J.; WYATT, T. A.; POOLE, J. A.; LEVAN, T. D.; CERUTIS, D. R.;
27 ROMBERGER, D. J. Maresin-1 reduces the pro-inflammatory response of bronchial epithelial cells
28 to organic dust. **Respiratory Research**, v. 14, n. 1, p. 51, 10 maio 2013. Disponível em:
29 </pmc/articles/PMC3668181/>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- 30 OLIVIA, L. W.; OBANDA, V.; BUCHT, G.; MOSOMTAI, G.; OTIENO, V.; AHLM, C.; EVANDER, M. Global
31 emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. **Infection ecology & epidemiology**, v.
32 5, n. 1, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26689654/>. Acesso em: 31 jan.
33 2024.
- 34 OMARI, S. A.; ADAMS, M. J.; GERAGHTY, D. P. TRPV1 Channels in Immune Cells and Hematological
35 Malignancies. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 79, p. 173–198, 1 jan. 2017.
36 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28528668/>. Acesso em: 16 out. 2023.
- 37 OZDEN, S.; HUERRE, M.; RIVIERE, J. P.; COFFEY, L. L.; AFONSO, P. V.; MOULY, V.; DE MONREDON,
38 J.; ROGER, J. C.; EL AMRANI, M.; YVIN, J. L.; JAFFAR, M. C.; FRENKIEL, M. P.; SOURISSEAU, M.;
39 SCHWARTZ, O.; BUTLER-BROWNE, G.; DESPRÈS, P.; GESSAIN, A.; CECCALDI, P. E. Human muscle
40 satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. **PloS one**, v. 2, n. 6, 2007. Disponível em:
41 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17565380/>. Acesso em: 31 jan. 2024.

- 1 PERL, A. Mechanisms of viral pathogenesis in rheumatic disease. **Annals of the Rheumatic**
2 **Diseases**, v. 58, n. 8, p. 454, 1999. Disponível em: </pmc/articles/PMC1752929/>. Acesso em: 1
3 fev. 2024.
- 4 PERNA, E.; AGUILERA-LIZARRAGA, J.; FLORENS, M. V.; JAIN, P.; THEOFANOUS, S. A.; HANNING, N.;
5 DE MAN, J. G.; BERG, M.; DE WINTER, B.; ALPIZAR, Y. A.; TALAVERA, K.; VANDEN BERGHE, P.;
6 WOUTERS, M.; BOECKXSTAENS, G. Effect of resolvins on sensitisation of TRPV1 and visceral
7 hypersensitivity in IBS. **Gut**, v. 70, n. 7, p. 1275–1286, 1 jul. 2021.
- 8 PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. **Nociceptor Sensory Neuron–Immune**
9 **Interactions in Pain and Inflammation****Trends in Immunology**Elsevier Ltd, 1 jan. 2017.
- 10 RASQUEL-OLIVEIRA, F. S.; SILVA, M. D. V. da; MARTELOSSI-CEBINELLI, G.; FATTORI, V.;
11 CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators: Endogenous Roles and
12 Pharmacological Activities in Infections. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 13, 1 jul. 2023.
13 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37446699/>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- 14 RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; CARDONA-OSPINA, J. A.; FERNANDA URBANO-GARZÓN, S.;
15 SEBASTIAN HURTADO-ZAPATA, J. Prevalence of Post-Chikungunya Infection Chronic
16 Inflammatory Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Arthritis Care & Research**, v. 68,
17 n. 12, p. 1849–1858, 1 dez. 2016. Disponível em:
18 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/acr.22900>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- 19 ROH, J.; GO, E. J.; PARK, J. W.; KIM, Y. H.; PARK, C. K. Resolvins: Potent Pain Inhibiting Lipid
20 Mediators via Transient Receptor Potential Regulation. **Frontiers in Cell and Developmental**
21 **Biology**, v. 8, n. December, p. 1–15, 2020.
- 22 ROJAS, M.; RESTREPO-JIMÉNEZ, P.; MONSALVE, D. M.; PACHECO, Y.; ACOSTA-AMPUDIA, Y.;
23 RAMÍREZ-SANTANA, C.; LEUNG, P. S. C.; ANSARI, A. A.; GERSHWIN, M. E.; ANAYA, J. M. Molecular
24 mimicry and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 95, p. 100–123, 1 dez. 2018. . Acesso
25 em: 1 fev. 2024.
- 26 ROMANOVSKY, A. A.; ALMEIDA, M. C.; GARAMI, A.; STEINER, A. A.; NORMAN, M. H.; MORRISON,
27 S. F.; NAKAMURA, K.; BURMEISTER, J. J.; NUCCI, T. B. The Transient Receptor Potential Vanilloid-
28 1 Channel in Thermoregulation: A Thermosensor It Is Not. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 3,
29 p. 228, set. 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC2763780/>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- 30 SCHILTE, C.; STAIKOVSKY, F.; COUDERC, T.; MADEC, Y.; CARPENTIER, F.; KASSAB, S.; ALBERT, M. L.;
31 LECUIT, M.; MICHAULT, A. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month
32 prospective longitudinal study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, 2013. Disponível em:
33 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23556021/>. Acesso em: 31 jan. 2024.
- 34 SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. **Biology and pathogenesis of chikungunya virus****Nature Reviews**
35 **Microbiology**jun. 2010.
- 36 SEGATO-VENDRAMETO, C. Z.; ZANLUCA, C.; ZUCOLOTO, A. Z.; ZANINELLI, T. H.; BERTOZZI, M. M.;
37 SARAIVA-SANTOS, T.; FERRAZ, C. R.; STAURENGO-FERRARI, L.; BADARO-GARCIA, S.; MANCHOPE,
38 M. F.; DIONISIO, A. M.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; BORGHI, S. M.; MOSIMANN, A. L. P.; CASAGRANDE,
39 R.; BORDIGNON, J.; FATTORI, V.; SANTOS, C. N. D. dos; VERRI, W. A. Chikungunya Virus and Its
40 Envelope Protein E2 Induce Hyperalgesia in Mice: Inhibition by Anti-E2 Monoclonal Antibodies
41 and by Targeting TRPV1. **Cells**, v. 12, n. 4, 1 fev. 2023.

- 1 SERHAN, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: To
2 resolve or not? **American Journal of Pathology**, v. 177, n. 4, p. 1576–1591, 2010. Disponível em:
3 <<http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100322>>.
- 4 SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510,
5 n. 7503, p. 92–101, 2014.
- 6 SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: A
7 new pharmacologic genus. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. SUPPL. 1, p. 200–215,
8 2008.
- 9 SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. **Chemical**
10 **Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5922–5943, 2011.
- 11 SERHAN, C. N.; YANG, R.; MARTINOD, K.; KASUGA, K.; PILLAI, P. S.; PORTER, T. F.; OH, S. F.; SPITE,
12 M. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving
13 actions. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 1, p. 15–23, 16 jan. 2009. Disponível
14 em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19103881/>>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- 15 SHRAIM, M. A.; MASSÉ-ALARIE, H.; HALL, L. M.; HODGES, P. W. Systematic Review and Synthesis
16 of Mechanism-based Classification Systems for Pain Experienced in the Musculoskeletal System.
17 **The Clinical journal of pain**, v. 36, n. 10, p. 793–812, 1 out. 2020. Disponível em:
18 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32852923/>>. Acesso em: 27 mar. 2024.
- 19 SIKANDAR, S.; DICKENSON, A. H. Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs. **Current**
20 **opinion in supportive and palliative care**, v. 6, n. 1, p. 17–26, mar. 2012. Disponível em:
21 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22246042/>>. Acesso em: 6 nov. 2023.
- 22 SILVA, M. D. V. da; PIVA, M.; MARTELOSSI-CEBINELLI, G.; RIBAS, M. S. R.; BIANCHINI, B. H. S.;
23 HEINTZ, O. K.; CASAGRANDE, R.; JR, W. A. V. Stem cells and pain. **World Journal of Stem Cells**, v.
24 15, n. 12, p. 1035, 12 dez. 2023. Disponível em: <[pmc/articles/PMC10762525/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4110762525/)>. Acesso em: 12
25 jan. 2024.
- 26 SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. **Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms,**
27 **and prospective intervention strategies** **Journal of Clinical Investigation** American Society for
28 Clinical Investigation, 1 mar. 2017.
- 29 SIMON, F.; JAVELLE, E.; CABIE, A.; BOUQUILLARD, E.; TROISGROS, O.; GENTILE, G.; LEPARC-
30 GOFFART, I.; HOEN, B.; GANDJBAKHCH, F.; RENE-CORAIL, P.; FRANCO, J. M.; CAUMES, E.; COMBE,
31 B.; POIRAUDEAU, S.; GANE-TROPLENT, F.; DJOSSOU, F.; SCHAERVERBEKE, T.; CRIQUET-HAYOT, A.;
32 CARRERE, P.; MALVY, D.; GAILLARD, P.; WENDLING, D. French guidelines for the management of
33 chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Medecine et maladies**
34 **infectieuses**, v. 45, n. 7, p. 243–263, 2015. Disponível em:
35 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26119684/>>. Acesso em: 31 jan. 2024.
- 36 SINGH, A.; KUMAR, A.; YADAV, R.; UVERSKY, V. N.; GIRI, R. Deciphering the dark proteome of
37 Chikungunya virus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- 38 SISIGNANO, M.; PARK, C. K.; ANGIANI, C.; ZHANG, D. D.; VON HEHN, C.; COBOS, E. J.;
39 GHASEMLOU, N.; XU, Z. Z.; KUMARAN, V.; LU, R.; GRANT, A.; FISCHER, M. J. M.; SCHMIDTKO, A.;
40 REEH, P.; JI, R. R.; WOOLF, C. J.; GEISSLINGER, G.; SCHOLICH, K.; BRENNEIS, C. 5,6-EET is released
41 upon neuronal activity and induces mechanical pain hypersensitivity via TRPA1 on central
42 afferent terminals. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 18, p. 6364–6372, 2012.

1 SONG, H.; ZHAO, Z.; CHAI, Y.; JIN, X.; LI, C.; YUAN, F.; LIU, S.; GAO, Z.; WANG, H.; SONG, J.;
2 VAZQUEZ, L.; ZHANG, Y.; TAN, S.; MOREL, C. M.; YAN, J.; SHI, Y.; QI, J.; GAO, F.; GAO, G. F. Molecular
3 Basis of Arthritogenic Alphavirus Receptor MXRA8 Binding to Chikungunya Virus Envelope
4 Protein. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1714- 1724.e12, 13 jun. 2019.

5 SOURISSEAU, M.; SCHILTE, C.; CASARTELLI, N.; TROUILLET, C.; GUIVEL-BENHASSINE, F.
6 Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 6, p. 89, 2007. Disponível em:
7 em: <www.plospathogens.org>.

8 SPICAROVA, D.; PALECEK, J. The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain
9 modulation. **Physiological research**, v. 57 Suppl 3, n. SUPPL. 3, 2008. Disponível em:
10 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18481913/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

11 SUGIMOTO, S.; MENA, H. A.; SANSBURY, B. E.; KOBAYASHI, S.; TSUJI, T.; WANG, C. H.; YIN, X.;
12 HUANG, T. L.; KUSUYAMA, J.; KODANI, S. D.; DARCY, J.; PROFETA, G.; PEREIRA, N.; TANZI, R. E.;
13 ZHANG, C.; SERWOLD, T.; KOKKOTOU, E.; GOODYEAR, L. J.; CYPESS, A. M.; LEIRIA, L. O.; SPITE, M.;
14 TSENG, Y. H. Brown adipose tissue-derived MaR2 contributes to cold-induced resolution of
15 inflammation. **Nature metabolism**, v. 4, n. 6, p. 775–790, 1 jun. 2022. Disponível em:
16 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35760872/>>. Acesso em: 10 set. 2023.

17 SUN, S.; XIANG, Y.; AKAHATA, W.; HOLDAWAY, H.; PAL, P.; ZHANG, X.; DIAMOND, M. S.; NABEL, G.
18 J.; ROSSMANN, M. G. Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and
19 antibodies show mechanisms of neutralization. **eLife**, v. 2013, n. 2, 18 fev. 2013.

20 SUTARIA, R. B.; AMARAL, J. K.; SCHOEN, R. T. Emergence and treatment of chikungunya arthritis.
21 **Current opinion in rheumatology**, v. 30, n. 3, p. 256–263, 1 maio 2018. Disponível em:
22 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29389830/>>. Acesso em: 4 fev. 2024.

23 TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. **Pattern Recognition Receptors and Inflammation**CellElsevier B.V., 2010.

24 TALAVERA, K.; STARTEK, J. B.; ALVAREZ-COLLAZO, J.; BOONEN, B.; ALPIZAR, Y. A.; SANCHEZ, A.;
25 NAERT, R.; NILIUS, B. Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: From structure
26 to disease. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 2 725, p. 803, 1 abr. 2020.

27 TAN, Z.; LIN, Z. J.; WU, L. J.; ZHOU, L. J. The Macrophage IL-23/IL-17A Pathway: A New Neuro-
28 Immune Mechanism in Female Mechanical Pain. **Neuroscience Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 453–455,
29 1 abr. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12264-021-00797-3>>.
30 Acesso em: 28 out. 2023.

31 TANABE, I. S. B.; TANABE, E. L. L.; SANTOS, E. C.; MARTINS, W. V.; ARAÚJO, I. M. T. C.; CAVALCANTE,
32 M. C. A.; LIMA, A. R. V.; CÂMARA, N. O. S.; ANDERSON, L.; YUNUSOV, D.; BASSI, Ê. J. **Cellular and**
33 **Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection**Frontiers in Cellular and Infection
34 **Microbiology**Frontiers Media S.A., 10 out. 2018.

35 TIAN, H.; LU, Y.; SHAH, S. P.; HONG, S. 14S,21R-dihydroxydocosahexaenoic acid remedies
36 impaired healing and mesenchymal stem cell functions in diabetic wounds. **The Journal of**
37 **biological chemistry**, v. 286, n. 6, p. 4443–4453, 11 fev. 2011. Disponível em:
38 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21112969/>>. Acesso em: 16 jan. 2024.

39 TIAN, H.; LU, Y.; SHAH, S. P.; WANG, Q.; HONG, S. 14S,21R-dihydroxy-docosahexaenoic acid
40 treatment enhances mesenchymal stem cell amelioration of renal ischemia/reperfusion injury.
41 **Stem cells and development**, v. 21, n. 7, p. 1187–1199, 1 maio 2012. Disponível em:
42 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21846180/>>. Acesso em: 16 jan. 2024.

- 1 TSETSARKIN, K. A.; CHEN, R.; WEAVER, S. C. **Interspecies transmission and chikungunya virus**
2 **emergence***Current Opinion in Virology*Elsevier B.V., 1 fev. 2016.
- 3 VANDEWAUW, I.; DE CLERCQ, K.; MULIER, M.; HELD, K.; PINTO, S.; VAN RANST, N.; SEGAL, A.;
4 VOET, T.; VENNEKENS, R.; ZIMMERMANN, K.; VRIENS, J.; VOETS, T. A TRP channel trio mediates
5 acute noxious heat sensing. *Nature*, v. 555, n. 7698, p. 662–666, 29 mar. 2018. Disponível em:
6 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29539642/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- 7 VASSILOPOULOS, D.; CALABRESE, L. H. Virally associated arthritis 2008: clinical, epidemiologic,
8 and pathophysiologic considerations. *Arthritis research & therapy*, v. 10, n. 5, 18 set. 2008.
9 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18828883/>>. Acesso em: 1 fev. 2024.
- 10 VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H.
11 **Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug**
12 **development?***Pharmacology and Therapeutics*out. 2006.
- 13 VOSS, J. E.; VANEY, M. C.; DUQUERROY, S.; VONRHEIN, C.; GIRARD-BLANC, C.; CRUBLET, E.;
14 THOMPSON, A.; BRICOGNE, G.; REY, F. A. Glycoprotein organization of Chikungunya virus
15 particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **2010 468:7324**, v. 468, n. 7324, p. 709–712,
16 1 dez. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature09555>>. Acesso em: 20
17 dez. 2023.
- 18 WAHID, B.; ALI, A.; RAFIQUE, S.; IDREES, M. **Global expansion of chikungunya virus: mapping**
19 **the 64-year history***International Journal of Infectious Diseases*Elsevier B.V., 1 maio 2017.
- 20 WOOLF, C. J. What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 11, p.
21 3742–3744, 2010.
- 22 WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*, v. 55, n. 3, p. 353–364,
23 2 ago. 2007. . Acesso em: 18 out. 2023.
- 24 WU, L. J.; SWEET, T. B.; CLAPHAM, D. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology.
25 LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacological Reviews*, v.
26 62, n. 3, p. 381, set. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20964900/>>. Acesso em: 7 dez.
27 2023.
- 28 XU, Q.; YAKSH, T. L. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus
29 neuropathic pain. *Current Opinion in Anaesthesiology*, v. 24, n. 4, p. 400–407, ago. 2011.
- 30 XU, Z. Z.; ZHANG, L.; LIU, T.; PARK, J. Y.; BERTA, T.; YANG, R.; SERHAN, C. N.; JI, R. R. Resolvins RvE1
31 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature Medicine*, v.
32 16, n. 5, p. 592–597, 2010.
- 33 YAM, M. F.; LOH, Y. C.; TAN, C. S.; ADAM, S. K.; MANAN, N. A.; BASIR, R. **General pathways of pain**
34 **sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation***International Journal of*
35 **Molecular Sciences**MDPI AG, 1 ago. 2018.
- 36 YAP, M. L.; KLOSE, T.; URAKAMI, A.; HASAN, S. S.; AKAHATA, W.; ROSSMANN, M. G. Structural
37 studies of Chikungunya virus maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*
38 **the United States of America**, v. 114, n. 52, p. 13703–13707, 26 dez. 2017.
- 39 YU, C. xiu; SHI, Z. an; OU, G. chun; CHEN, X. ju; LIU, Q.; ZENG, D.; NIE, X. ju; CHEN, J. jun. Maresin-
40 2 alleviates allergic airway inflammation in mice by inhibiting the activation of NLRP3

1 inflammasome, Th2 type immune response and oxidative stress. **Molecular Immunology**, v. 146,
2 p. 78–86, 1 jun. 2022.

3 ZAID, A.; GÉRARDIN, P.; TAYLOR, A.; MOSTAFAVI, H.; MALVY, D.; MAHALINGAM, S. Chikungunya
4 Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management.
5 **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 70, n. 4, p. 484–495, 1 abr. 2018. Disponível em:
6 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29287308/>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

7 ZHANG, H.; WANG, C.; ZHANG, K.; KAMAU, P. M.; LUO, A.; TIAN, L.; LAI, R. The role of TRPA1
8 channels in thermosensation. **Cell Insight**, v. 1, n. 6, p. 100059, dez. 2022.

9 ZHANG, R.; KIM, A. S.; FOX, J. M.; NAIR, S.; BASORE, K.; KLIMSTRA, W. B.; RIMKUNAS, R.; FONG,
10 R. H.; LIN, H.; PODDAR, S.; CROWE, J. E.; DORANZ, B. J.; FREMONT, D. H.; DIAMOND, M. S. Mxra8
11 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 24 maio
12 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29769725/>>. Acesso em: 10 set. 2023.

13 ZIMMERMAN, O.; ZIMMERMAN, M. I.; RAJU, S.; NELSON, C. A.; ERRICO, J. M.; MADDEN, E. A.;
14 HOLMES, A. C.; HASSAN, A. O.; VANBLARGAN, L. A.; KIM, A. S.; ADAMS, L. J.; BASORE, K.;
15 WHITENER, B. M.; PALAKURTY, S.; DAVIS-ADAMS, H. G.; SUN, C.; GILLILAND, T.; EARNEST, J. T.;
16 MA, H.; EBEL, G. D.; ZMASEK, C.; SCHEUERMANN, R. H.; KLIMSTRA, W. B.; FREMONT, D. H.;
17 DIAMOND, M. S. Vertebrate-class-specific binding modes of the alphavirus receptor MXRA8. **Cell**,
18 v. 186, n. 22, p. 4818- 4833.e25, 26 out. 2023. . Acesso em: 30 jan. 2024.

19

20

1 ANEXO - Cópia do Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (Nº
2 056.2020)

OF. CIRC. CEUA Nº 144/2020

Londrina, 19 de novembro de 2020.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação do efeito analgésico dos lipídeos pró-resolução em modelo murino de dor e infecção pelos vírus Dengue e Chikungunya e pela proteína E2 do vírus Chikungunya" protocolo CEUA nº 056.2020 sob a responsabilidade de Waldiceu Aparecido Verri Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL) em reunião realizada em 17/11/2020.


Este projeto tem por objetivos avaliação dos potenciais analgésico e mecanismos de ação do tratamento intratecal com 15-Epi-lipoxina A4 (15-epi-LXA4), Resolvina D1, D2 e D5 (RvD1, RvD2 e RvD5), Maresina 2(MaR2), e Protectina DX (PDX) em modelo murino de dor induzida pelos vírus Dengue e Chikungunya e pela proteína E2 do vírus Chikungunya. Grau de invasividade: 3.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/01/2021 a 01/01/2025
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogênico/ Swiss
Nº de animais	4.608
Peso/ Idade	20-25 g/ 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Medula espinal, gânglio da raiz dorsal.

Cumprindo orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.


Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UUEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr (a). Waldiceu Aparecido Verri Junior

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Patológicas/ CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/ CCB

C/C para o Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina/ CCB

Campus: Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone: (63) 3371-4000 FAX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

3

4