



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

GUILHERME ALVES CHAVES DA SILVA

Avaliação da atividade antiviral e imunomoduladora
de frações da alga *Dictyota menstrualis* contra o
vírus Mayaro.

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal Fluminense visando a
obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Caroline de Souza Barros

**Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Izabel Christina Nunes de
Palmer Paixão**

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio César Cirne dos Santos



Niterói
2026

GUILHERME ALVES CHAVES DA SILVA

**Avaliação da atividade antiviral e imunomoduladora de
frações da alga *Dictyota menstrualis* contra o vírus
Mayaro**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Immunovirologia do
Departamento de Immunobiologia e no Laboratório de Virologia Molecular e
Celular e Biotecnologia Marinha do Departamento de Biologia Celular e
Molecular, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia,
Universidade Federal Fluminense. Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPERJ.

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade
Federal Fluminense
visando a obtenção do grau
de Mestre em Ciências e
Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Caroline de Souza Barros

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio César Cirne dos Santos

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

D111a Da Silva, Guilherme Alves Chaves
Avaliação da atividade antiviral e imunomoduladora de
frações da alga Dictyota menstrualis contra o vírus Mayaro.
/ Guilherme Alves Chaves Da Silva. - 2026.
83 f.: il.

Orientador: Caroline de Souza Barros.
Coorientador: Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão /
Cláudio César Cirne Dos Santos.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Instituto de Biologia, Niterói, 2026.

1. Arbovirus. 2. Mayaro. 3. Antiviral. 4. Citometria. 5.
Produção intelectual. I. Barros, Caroline de Souza,
orientadora. II. Paixão / Cláudio César Cirne Dos Santos,
Izabel Christina Nunes de Palmer, coorientador. III.
Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV.
Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

GUILHERME ALVES CHAVES DA SILVA

**Avaliação da atividade antiviral e imunomoduladora de
frações da alga *Dictyota menstrualis* contra o vírus
Mayaro**

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade
Federal Fluminense
visando a obtenção do grau
de Mestre em Ciências e
Biotecnologia.

Banca Examinadora:

**Prof.^a Dra. Caroline de Souza Barros – Departamento de Imunobiologia –
Universidade Federal Fluminense (Orientadora/Presidente)**

**Prof.^a Dra. Helena Carla Castro Cardoso de Almeida – Departamento de Biologia
Celular e Molecular – Universidade Federal Fluminense.**

**Prof. Dr. Paulo Roberto Soares Stephens – Laboratório de Inovações em Terapias,
Ensino e Bioprodutos (LITEB) - Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).**

**Prof.^a Dra. Viveca Antonia Giongo Galvão da Silva - Universidade Estácio de Sá
(UNESA)**

**Prof. Dr. Maurício Afonso Verícimo – Departamento de Imunobiologia –
Universidade Federal Fluminense (UFF) (Suplente).**

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, por ser meu guia e força. Aos meus pais, irmãos, família e amigos, pelo amor e apoio incondicional.

“Sou a continuação de um sonho que começou muito antes de mim” - Autoral

AGRADECIMENTOS

Sou grato, principalmente, a Deus, por me permitir viver e me conceder a oportunidade de chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Neri e Marcio, por me educarem e me incentivarem a estudar, mesmo diante de todas as adversidades. Aos meus irmãos, Claiton e Nicolay, por estarem comigo em todos os momentos.

Agradeço à Raquel e à Liz pela alegria de fazerem parte da minha vida.

Aos meus avós, tias, tios e primos, por sempre me proporcionarem força e motivação.

À minha amiga Luana, por estar sempre ao meu lado e me motivar em cada etapa desta caminhada. Aos meus amigos Arthur, Alan e Marcely, por cada momento feliz compartilhado ao longo dessa jornada.

À minha orientadora, Caroline Barros, por abrir as portas da pesquisa para mim, pelos ensinamentos e por contribuir para o meu crescimento como pesquisador e profissional.

Ao meu coorientador, Cláudio Cirne, e à minha coordenadora, Izabel Paixão, por todos os ensinamentos, orientações e pelo apoio ao longo do meu processo de formação, além de serem referências como pesquisadores e professores.

Aos meus amigos de laboratório, Max, Priscilla, Victoria, Rafael, Carolina, Raynnan, Emilly, Andresa e Rayane, pela parceria, amizade, aprendizado, incentivo e suporte ao longo de cada etapa da pesquisa, tornando essa caminhada mais leve e especial.

Aos meus amigos da UFF e da vida, Amanda, Rute e Bia, pelos momentos de alegria, conversas, amizade e união, que foram essenciais para tornar essa caminhada mais leve.

À professora Ana Pinto e à Luciene, pelos ensinamentos e pelo auxílio com as culturas de células.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos demais amigos da sala 522, por cada momento de aprendizado, convivência e construção profissional.

À professora Luciana Paiva, à Mayara, à Maria e ao Marlon, por toda a ajuda e assistência durante os experimentos.

Às minhas amigas Lis e Júlia, por me auxiliarem durante meu crescimento profissional na área da Educação.

À professora Kissila Rabelo, da UERJ, e ao professor Alexandre Rodrigues, da UFF, pelo auxílio e pela contribuição para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Fabiana e Anita, por me ajudarem e me darem força durante toda a minha trajetória acadêmica.

À Marcela Obando e às professoras Diana Negrão e Valéria Teixeira, por disponibilizarem as substâncias utilizadas neste trabalho.

Aos meus professores da UFF e do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia (PPBI), por cada ensinamento e pela contribuição para minha formação pessoal e profissional.

Ao professor Mauricio Afonso, por aceitar revisar este trabalho e por toda a contribuição ao longo dessa etapa.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e contribuírem para a avaliação e o aprimoramento deste trabalho.

Por fim, agradeço aos laboratórios da UFF e aos órgãos de fomento PIBIC, CNPq, CAPES e FAPERJ, por tornarem possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 FAMÍLIA TOGAVIRIDAE.....	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR MAYV	17
1.3 ESTRUTURA DO VÍRUS MAYARO.....	19
1.4 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL	20
1.5 TRANSMISSÃO	23
1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	25
1.7 TROPISMO CELULAR E TECIDUAL DO MAYV.....	27
1.8 ALFAVÍRUS E SUA INTERAÇÃO COM O SISTEMA IMUNOLÓGICO..	28
1.9 ANTIVIRAIS.....	29
1.10 ALGA <i>Dictyota menstrualis</i>	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.10 OBJETIVO GERAL	33
2.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. SUBSTÂNCIAS, CÉLULAS E VÍRUS	34
3.2. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	34
3.2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES DA ALGA <i>D. Menstrualis</i> EM CÉLULAS VERO	34
3.2.2. AVALIAR A ATIVIDADE ANTIVIRAL DA FRAÇÃO DA ALGA <i>D. menstrualis</i> EM CULTURA DE NEURÔNIOS.....	36
3.2.3. AVALIAR A ATIVIDADE VIRUCIDA DA FRAÇÃO DA ALGA <i>D. menstrualis</i> EM CÉLULAS VERO INFECTADAS.	36
3.2.4. AVALIAR A INIBIÇÃO DA ADSORÇÃO DA FRAÇÃO DA ALGA <i>D. menstrualis</i> EM CÉLULAS VERO INFECTADAS.	37
3.3. ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	38
3.3.1. ANIMAIS	38
3.3.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA FRAÇÃO DA ALGA <i>D. menstrualis</i> EM CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEAS INFECTADAS.	38

3.3.3.	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS NO BAÇO E NOS LINFONODOS DOS CAMUNDONGOS TRATADOS E INFECTADOS COM MAYV.	39
3.3.4.	ANÁLISE DE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELOS VÍRUS NOS MÚSCULOS DA PATA DOS ANIMAIS... ..	40
3.3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4	RESULTADOS	41
4.1	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	41
4.1.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS FRAÇÕES DA ALGA <i>D. menstrualis</i> EM CÉLULAS VERO INFECTADAS	41
4.1.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES DA ALGA <i>D. menstrualis</i> EM CULTURA DE NEURÔNIOS.	45
4.1.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA DA FRAÇÃO DA ALGA <i>D. menstrualis</i> EM CÉLULAS VERO INFECTADAS.	47
4.1.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ADSORÇÃO DA FRAÇÃO DA ALGA <i>D. menstrualis</i> EM CÉLULAS VERO INFECTADAS. ...	48
4.2	ANÁLISE DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA.....	49
4.2.1	INCHAÇO DA PATA	50
4.2.2	PESO CORPORAL.....	52
4.2.3	ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO 54	
4.2.4	ANÁLISE DO MÚSCULO DA PATA	59
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
6.1	CONCLUSÃO	69
6.2	PERSPECTIVAS.....	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Controle de célula
CMC	Carboximetilcelulose
CO₂	Dióxido de carbono
CV	Controle de vírus
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBDM	Extrato Bruto Dictyota menstrualis
MAYV	Vírus Mayaro
mL	Mililitro
MOI	Multiplicidade de infecção
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nM	Nanomolar
PFU	Unidade formadora de placa
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Vero	Linhagem de células epiteliais derivadas de rim de macaco-verde-africano

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da organização do genoma dos vírus CHIKV (A) e MAYV (B).....	16
Figura 2 - Distribuição global do vírus Mayaro..	18
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura e do genoma do vírus mayaro..	20
Figura 4 - Ciclo de multiplicação do Mayaro.....	22
Figura 5 - Cronologia dos eventos do ciclo de multiplicação do mayv.	23
Figura 6 - Distribuição mundial de <i>ae. Albopictus</i> e <i>ae. Aegypti</i>	25
Figura 7 - Os sintomas da infecção por MAYV e CHIKV são mostrados..	26
Figura 8. Avaliação do percentual de inibição das frações da alga <i>d. Menstrualis</i>	42
Figura 9. Percentual de inibição do vírus Mayaro pelas frações da alga <i>D. Menstrualis</i> (20 µg/ml).....	42
Figura 10. Avaliação do perfil ANTI-MAYV (EC50) em células vero..	44
Figura 11. Avaliação da atividade ANTI-MAYV da FRAÇÃO FAC-1 em diferentes concentrações em células Vero..	45
Figura 12. Avaliação da atividade antiviral da FAC-1 em cultura de neurônios.	47
Figura 13. Atividade virucida da fração FAC-1 contra o MAYV em diferentes concentrações.	48
Figura 14. Efeito da fração FAC-1 na adsorção do MAYV em células Vero. ...	49
Figura 15. Linha do tempo e evolução do inchaço na pata dos animais..	51
Figura 16. Evolução do edema nas patas dos animais..	52
Figura 17. Evolução do peso corporal (%) dos camundongos ao longo de 13 dias pós-infecção (DPI).....	53
Figura 18. Perfil imunológico de linfócitos T no baço de camundongos após 14 dias de infecção e tratamento.	54
Figura 19. Perfil imunológico de linfócitos B no baço de camundongos após 14 dias de infecção e tratamento.	55
Figura 20. População de linfócitos T no linfonodo inguinal de camundongos após 14 dias de infecção e tratamento..	56

Figura 21. População de linfócitos B no linfonodo inguinal após 14 dias de infecção e tratamento.....	57
Figura 22. Razão entre linfócitos T CD8 ⁺ e células T reguladoras (CD4 ⁺ FOXP3 ⁺) no baço de camundongos infectados.....	58
Figura 23. Razão entre linfócitos T CD8 ⁺ e células T reguladoras (CD4 ⁺ FOXP3 ⁺) no linfonodo inguinal..	58
Figura 24. Imagens histopatológicas do músculo da pata de camundongos submetidos aos ensaios de eficácia terapêutica..	60

RESUMO

O vírus Mayaro (MAYV), pertencente à família *Togaviridae*, é um arbovírus transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Haemagogus*, estando associado a surtos de febre e artralgia em regiões tropicais. Atualmente, não existem tratamentos específicos disponíveis para combater a infecção pelo MAYV; portanto, é importante buscar novas substâncias com potencial terapêutico. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antiviral e imunomoduladora de frações ricas em diterpenos obtidas da alga *Dictyota menstrualis* contra o vírus Mayaro. Ensaios *in vitro* foram realizados utilizando células Vero e cultura primária de neurônios de retina de embrião de galinha, enquanto os ensaios *in vivo* foram conduzidos em camundongos BALB/c fêmeas infectados pelo MAYV e tratados com a fração selecionada na dose de 20 mg/kg durante 14 dias. Os estudos de atividade antiviral *in vitro* evidenciaram que as frações do extrato testadas na concentração de 20 µg/mL apresentaram 97% de inibição para a FAC-1, 64% para a FAC-2, 15% para a FAC-3 e 32% para o extrato bruto. A FAC-1 apresentou o melhor resultado e foi selecionada para a determinação da concentração capaz de reduzir 50% da replicação viral (EC_{50}), apresentando um valor de EC_{50} de 4,1 µg/mL, com a inibição ocorrendo de maneira dose-dependente. A FAC-1 foi selecionada como a mais promissora para a continuidade dos experimentos subsequentes. Com isso, a fração FAC-1 também demonstrou efeito protetor contra a infecção pelo MAYV em cultura de neurônios, principalmente na concentração de 20 µg/mL, sendo capaz de preservar a morfologia e a integridade celular. Nos experimentos de mecanismo de ação realizados em células Vero, o ensaio virucida demonstrou um efeito sobre as partículas virais, promovendo 28% de inibição da infectividade do MAYV na concentração de 20 µg/mL. Por outro lado, no ensaio de adsorção, a fração demonstrou forte capacidade de interferir na ligação do vírus às células Vero, atingindo 81% de inibição, evidenciando interferência direta na adsorção. Os ensaios *in vivo* demonstraram que o tratamento com a fração reduziu significativamente o edema de pata já no 5º dia pós-infecção. A análise por citometria de fluxo revelou, ainda, um efeito imunomodulador da FAC-1. Nos linfonodos inguinais, observou-se aumento da porcentagem de linfócitos T CD4⁺, acompanhado por redução na porcentagem de células T reguladoras nos animais tratados com a FAC-1. Além disso, as análises histopatológicas demonstraram que os animais tratados com a fração FAC-1 apresentaram menor comprometimento do músculo da pata em comparação aos grupos controles infectados. Assim, os resultados demonstram que a fração FAC-1 apresenta potencial antiviral e imunomodulador contra o MAYV, podendo contribuir para o desenvolvimento de antivirais derivados de produtos naturais.

Palavras-chave: Arbovírus, Mayaro, Antiviral, *In vivo*, Citometria.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV), belonging to the family *Togaviridae*, is an arbovirus mainly transmitted by mosquitoes of the genus *Haemagogus* and is associated with outbreaks of fever and arthralgia in tropical regions. Currently, there are no specific treatments available to combat MAYV infection; therefore, it is important to search for new substances with therapeutic potential. This study aimed to evaluate the antiviral and immunomodulatory activity of diterpene-rich fractions obtained from the alga *Dictyota menstrualis* against Mayaro virus. *In vitro* assays were performed using Vero cells and primary cultures of chick embryo retinal neurons, while *in vivo* assays were conducted in female BALB/c mice infected with MAYV and treated with the selected fraction at a dose of 20 mg/kg for 14 days. The *in vitro* antiviral activity studies showed that the extract fractions tested at a concentration of 20 µg/mL exhibited 97% inhibition for FAC-1, 64% for FAC-2, 15% for FAC-3, and 32% for the crude extract. FAC-1 showed the best result and was selected to determine the concentration capable of reducing viral replication by 50% (EC₅₀), with an EC₅₀ value of 4.1 µg/mL and inhibition occurring in a dose-dependent manner. FAC-1 was selected as the most promising fraction for the subsequent experiments. In addition, the FAC-1 fraction demonstrated a protective effect against MAYV infection in neuronal cultures, particularly at a concentration of 20 µg/mL, preserving cell morphology and integrity. In the mechanism-of-action experiments performed in Vero cells, the virucidal assay demonstrated an effect on viral particles, resulting in 28% inhibition of MAYV infectivity at a concentration of 20 µg/mL. On the other hand, in the adsorption assay, the fraction demonstrated a strong ability to interfere with viral binding to Vero cells, reaching 81% inhibition and indicating direct interference with viral adsorption. The *in vivo* assays demonstrated that treatment with the fraction significantly reduced paw edema as early as the 5th day post-infection. Flow cytometry analysis also revealed an immunomodulatory effect. In the inguinal lymph nodes, an increase in the percentage of CD4⁺ T lymphocytes was observed, accompanied by a reduction in the percentage of regulatory T cells in animals treated with FAC-1. In addition, histopathological analyses demonstrated that animals treated with the FAC-1 fraction exhibited less muscle damage in the paw compared with the infected control groups. Thus, the results demonstrate that the FAC-1 fraction has antiviral and immunomodulatory potential against MAYV and may contribute to the development of antivirals derived from natural products

Keywords: Arbovirus, Mayaro, Antiviral, *In vivo*, Cytometry

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus representam uma ameaça considerável e persistente em diferentes regiões tropicais, devido às aceleradas alterações climáticas, ao desmatamento e às ocupações irregulares em áreas urbanas, que, por sua vez, produzem condições sanitárias precárias, promovendo a amplificação e a propagação dos vetores transmissores desses vírus (REIMBERG *et al.*, 2023). Sendo assim, a urbanização e as mudanças climáticas podem ajudar o vírus Mayaro (MAYV) a se espalhar para novos lugares. Logo, o aumento da população de mosquitos vetores em áreas urbanas, particularmente *Aedes aegypti*, pode aumentar o risco de surtos mais graves, como foi o caso da Zika e da Chikungunya (BRUSTOLIN *et al.*, 2024).

A febre MAYV está associada a surtos localizados registrados nas Américas, incluindo a região Amazônica do Brasil. Porém, está se espalhando rapidamente para outras regiões da América Latina. Sendo assim, é provável que a carga global desta febre ainda seja amplamente subestimada devido à falta de diagnósticos adequados e precisos (DIAGNE *et al.*, 2020).

Os principais sintomas do MAYV incluem febre, mialgia e artralgia, que podem persistir por meses a anos. Em alguns casos, também podem ocorrer complicações graves, como miocardite e manifestações neurológicas e hemorrágicas (ANDREOLLA; BORGES; BORDIGNON; DUARTE DOS SANTOS, 2022). Além disso, na ausência de medicamentos aprovados, o tratamento limita-se ao controle dos sintomas, sendo baseado principalmente no uso de analgésicos e/ou anti-inflamatórios não esteroides (PASCHOALINO *et al.*, 2023). Nesse contexto, algas, invertebrados e micro-organismos marinhos têm demonstrado potencial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para diversas doenças (YASUHARA-BELL *et al.*, 2010). Com isso, a alga *D. menstrualis* mostra-se promissora no combate a essa arbovirose, visto que o MAYV apresenta potencial para se tornar uma ameaça à saúde pública.

1.1 FAMÍLIA TOGAVIRIDAE

A família *Togaviridae* abrange diferentes vírus transmitidos por artrópodes, dentre eles o MAYV e o vírus Chikungunya (CHIKV), vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus*. Ambos possuem uma próxima relação filogenética e estão envolvidos em surtos de doença febril aguda com artropatia (SILVA *et al.*, 2025).

O vírus Mayaro é um arbovírus negligenciado, endêmico na América Latina e no Caribe, sendo descrito nessa região desde a década de 1950. Ele foi isolado a primeira vez em 1954 em Trinidad e Tobago em humanos. Já o CHIKV foi isolado pela primeira vez em 1952, no território da atual Tanzânia e assim como o MAYV, compartilham áreas geográficas de transmissão na América do Sul (DE SOUZA *et al.*, 2025).

Os vírus pertencentes a esta família irão compartilhar similaridades genéticas e biológicas, tais como seus genomas (Figura 1) consistindo em aproximadamente 12 quilo bases de RNA de sentido positivo revestidos por um nucleocapsídeo, codificando as quatro proteínas não estruturais NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e cinco proteínas estruturais, abrangendo três proteínas do envelope (E1-3), capsídeo e a proteína 6K, distribuídas em duas estruturas de leitura aberta (SRIDHAR *et al.*, 2024).

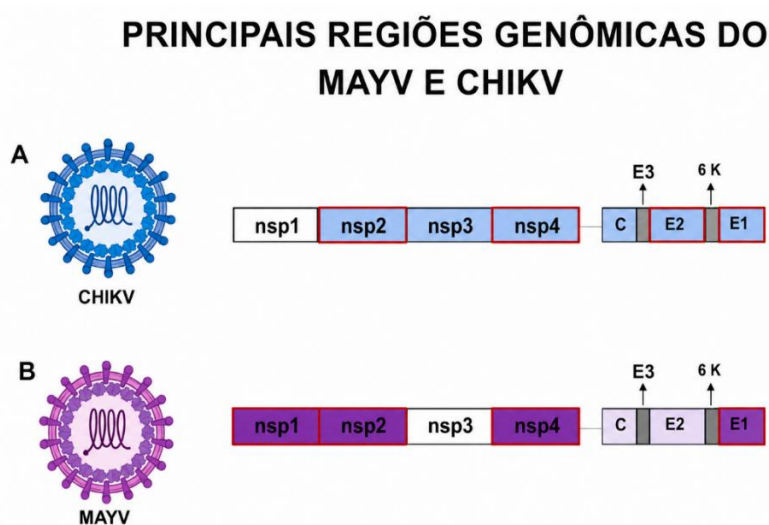


Figura 1 - Representação esquemática da organização do genoma dos vírus CHIKV (A) e MAYV (B). Adaptada de (SRIDHAR *et al.*, 2024).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR MAYV

A partir da sua caracterização em ilhas da região do Caribe, infectando humanos, o MAYV, originário das Américas, teve sua primeira identificação (Figura 2) no Brasil em 1955, com os primeiros casos humanos autóctones do MAYV (PINHEIRO *et al.*, 1998), a qual ocorreu a partir de um surto de febre aguda que atingiu cerca de 100 trabalhadores rurais na região de Belém (PA), às margens do rio Guamá (DE BARROS *et al.*, 2021) .

Posteriormente, a febre do Mayaro passou a ser reportada de forma esporádica em diferentes países da América Central e da América do Sul, sendo considerada endêmica em determinadas regiões da Amazônia e do Centro-Oeste do Brasil. Em 1967 foi isolado pela primeira vez na América do Norte, a partir de aves migratórias capturadas em Louisiana, Estados Unidos (SILVA 2024) .

Até o momento, o MAYV apresenta três genótipos descritos, sendo: D, L e N (CAICEDO *et al.*, 2021; MARINHO *et al.*, 2024). As análises filogenéticas demonstram que os isolados tendem a se agrupar de acordo com a proximidade geográfica e temporal, indicando a presença de linhagens circulantes nas Américas. Além disso, a plasticidade genômica do vírus pode ser observada pela identificação de recombinantes heterólogos L/D pela introdução do genótipo D

nos Estados Unidos, possivelmente associada às aves, como as isoladas de *Icterus spurius* (MARINHO *et al.*, 2024).

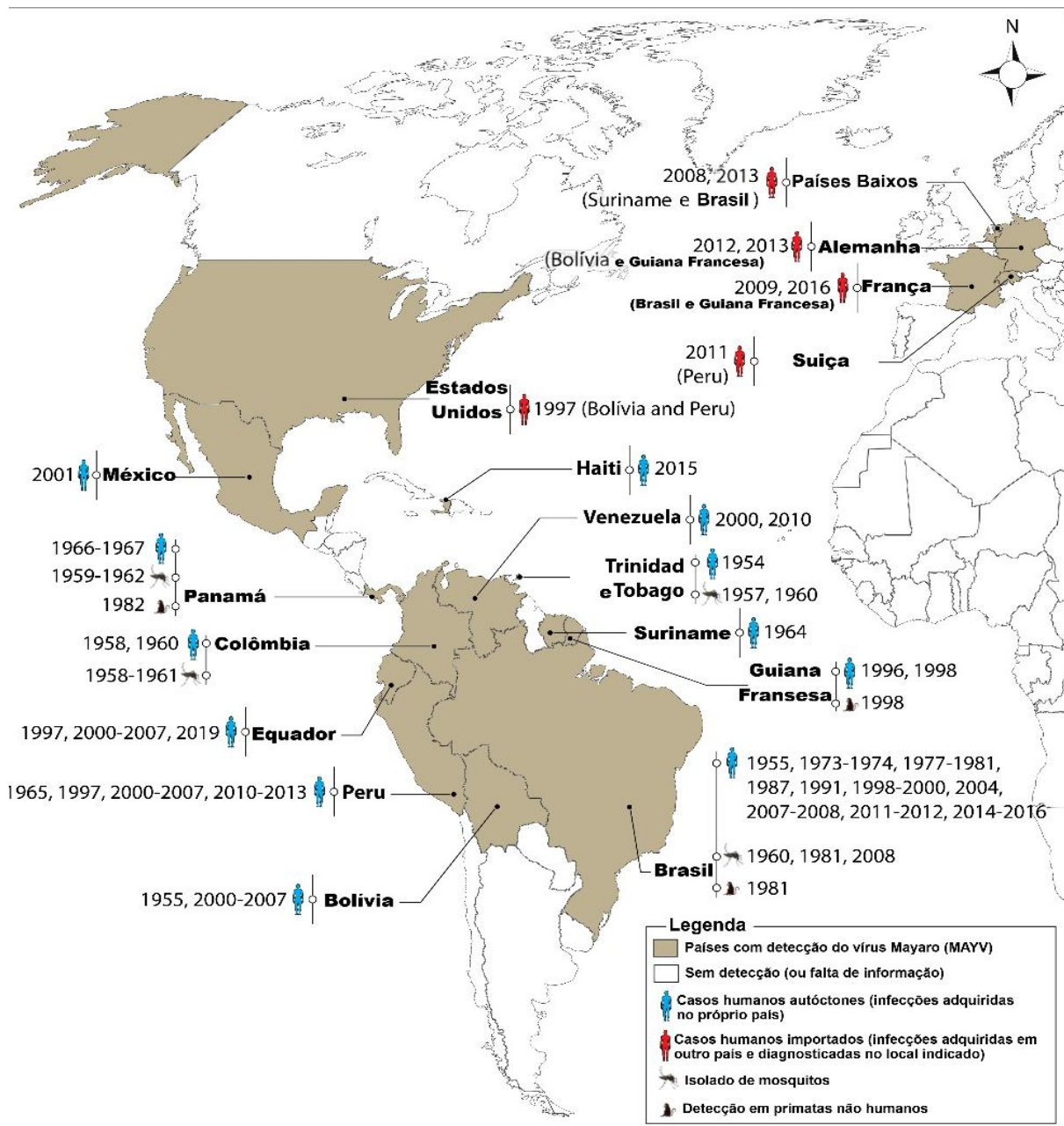


Figura 2 - Distribuição global do vírus Mayaro. Adaptado de (Diagne *et al.*, 2020).

Estima-se que aproximadamente 58,9 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção pelo MAYV, incluindo cerca de 46,2 milhões no Brasil, principalmente em estados como Pará, Amazonas e Goiás, onde as condições ambientais favorecem a transmissão do vírus (MARTINS-FILHO *et al.*, 2024). Em 2020, foi emitido um alerta epidemiológico na Guiana Francesa após a

confirmação laboratorial de 13 casos da doença em um curto período de tempo. Nesse surto, observou-se que 85% dos pacientes viviam em áreas urbanas costeiras, demonstrando um possível desvio do padrão de transmissão tradicionalmente silvestre (WHO, 2020).

No Brasil, o monitoramento realizado entre os anos de 2014 e 2024 demonstrou o registro de 314 casos de febre de Mayaro no território nacional (MARQUES *et al.*, 2024). Além disso, dados divulgados pelo Ministério da Saúde demonstraram a confirmação de 219 casos apenas entre as semanas epidemiológicas 01 e 34 do ano de 2025, concentrando-se principalmente no estado do Pará, com 98 notificações, seguido pelo Amazonas, com 60 casos, e por Roraima, com 36 registros (BRASIL, 2025).

De forma semelhante, a análise de 822 amostras provenientes de pacientes febris coletadas no estado de Roraima, entre os anos de 2018 e 2021, demonstrou a presença de RNA do MAYV em 3,4% dos casos avaliados, evidenciando a circulação ativa desse arbovírus na região amazônica (FORATO *et al.*, 2024). Atualmente, o monitoramento da circulação do MAYV é realizado por meio de uma estratégia laboratorial sentinela de busca ativa, na qual amostras negativas para Dengue, Zika e Chikungunya são submetidas ao diagnóstico diferencial para identificar a circulação do Mayaro (BRASIL, 2024).

Sendo assim, o monitoramento desse arbovírus é de grande importância, uma vez que modelos experimentais já demonstraram a competência vetorial de populações urbanas de *Aedes aegypti*, indicando o potencial estabelecimento da transmissão do MAYV em humanos, especialmente em regiões densamente povoadas (KROKOVSKY *et al.*, 2023).

1.3 ESTRUTURA DO VÍRUS MAYARO

A partícula viral do MAYV apresenta um genoma constituído por RNA de fita simples de sentido positivo, com aproximadamente 11,5 kb, associado à proteína do capsídeo (C) e envolto por um envelope lipídico derivado da membrana do hospedeiro, que contém as glicoproteínas E1 e E2 (Figura 3A). O genoma do

MAYV (Figura 3B) é organizado em duas regiões de leitura aberta, sendo a primeira localizada na região 5' UTR, responsável pela codificação das proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, enquanto a segunda, está situada após o gene nsP4, codifica as proteínas estruturais CP, E3, E2, TF, 6K e E1 (MARINHO *et al.*, 2024). Dados de microscopia eletrônica demonstram que o vírion apresenta aproximadamente 70 nm de diâmetro e possui um capsídeo icosaédrico formado pela proteína do capsídeo (Figura 3C), o qual é recoberto por uma membrana de envelope contendo as glicoproteínas E1, E2 e E3 (PASCHOALINO *et al.*, 2023).

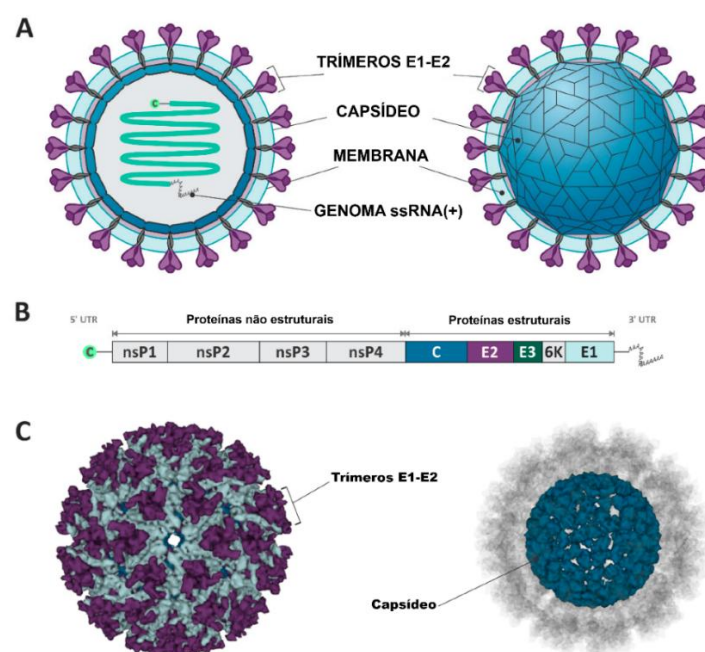


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura e do genoma do vírus mayaro. (A) e (C) O vírion é constituído por trímeros das glicoproteínas E1–E2, pela proteína do capsídeo e por um genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva (ssRNA⁺). (B) O genoma viral é responsável por codificar proteínas estruturais e não estruturais. Adaptado de (MARINHO *et al.*, 2024).

1.4 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de multiplicação do MAYV começa com a adsorção da partícula viral através de receptores de membrana da célula hospedeira (Figura 4), tais como o MXRA8, deflagrando a endocitose, que ocorre intermediada pela proteína clatrina ou através de uma fosseta envolta por caveolina (CARVALHO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). Posteriormente, por meio de endocitose, a partícula

viral entra na célula e se direciona para o citoplasma celular. Ocorre a diminuição do pH no compartimento endossomal, e o RNA genômico viral é liberado com o desmonte da estrutura básica do vírus. O RNA viral é constituído por duas estruturas de leitura aberta (ORFs), sendo a primeira traduzida em proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, que integram o complexo de replicação e são utilizadas posteriormente como molde para a produção de novas fitas de RNA de polaridade positiva, bem como do RNA subgenômico 26S (DIAGNE *et al.*, 2020).

A partir do RNA de fita negativa gerado pelo complexo de replicação, ocorre a transcrição do RNA subgenômico 26S, responsável pela tradução da segunda ORF viral. Essa ORF é traduzida em uma poliproteína estrutural precursora, que é posteriormente clivada, originando as proteínas estruturais do vírus, incluindo o capsídeo (C), as glicoproteínas de envelope E1, E2 e E3, além da proteína 6K, descrita como uma vioporina (PASCHOALINO *et al.*, 2023). Após a síntese, as proteínas estruturais são processadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, onde as glicoproteínas sofrem maturação e são transportadas para a membrana plasmática da célula hospedeira. O RNA genômico recém-sintetizado associa-se à proteína do capsídeo, formando o nucleocapsídeo, que se liga às glicoproteínas virais inseridas na membrana celular, permitindo a montagem das partículas virais. Por fim, os vírions maduros são liberados para o meio extracelular por brotamento, completando o ciclo de multiplicação do MAYV (DIAGNE *et al.*, 2020).

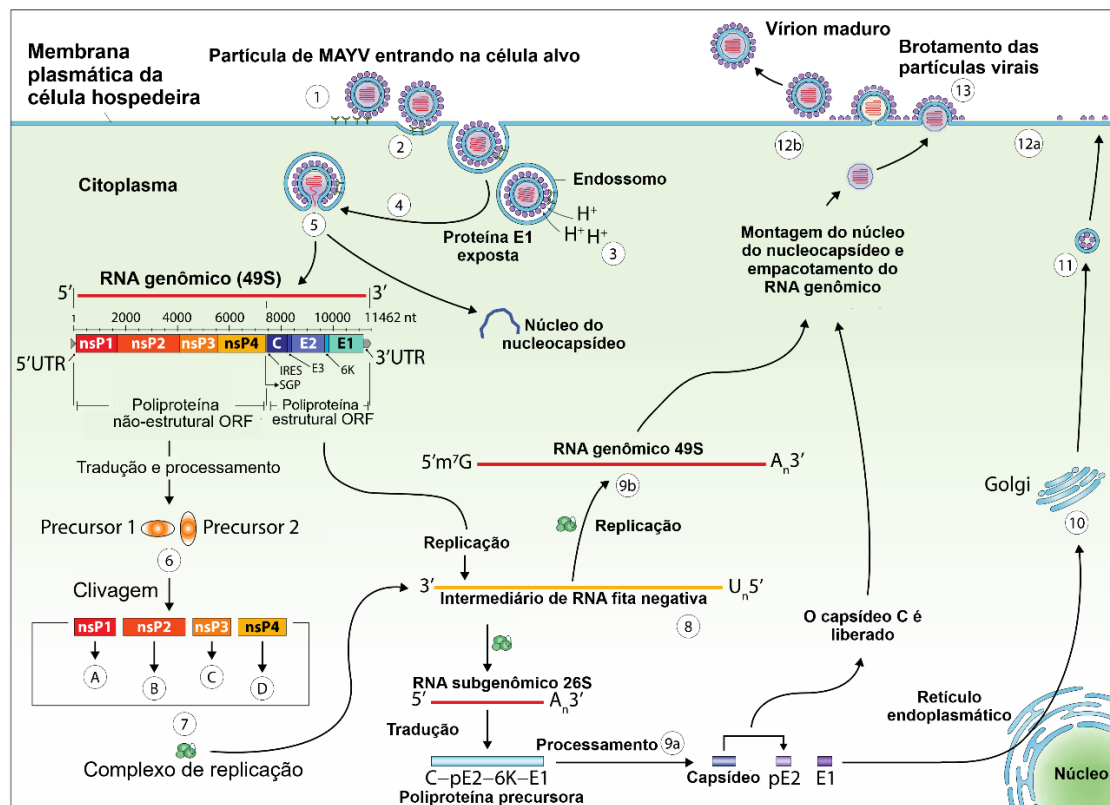


Figura 4 - Ciclo de multiplicação do Mayaro. O ciclo de multiplicação do MAYV envolve proteínas estruturais e não estruturais. A nsP1 (A) é responsável pela formação e pelo capeamento do RNA viral, a nsP2 (B) possui atividades enzimáticas, a nsP3 (C) compõe o complexo de replicação e a nsP4 (D) é a RNA polimerase viral. O processo inicia-se com a ligação do vírus à célula hospedeira e sua internalização por endocitose (1). A internalização do vírus ocorre por meio de receptores celulares (2). A acidificação do endossomo expõe a proteína E1 (3). A proteína E1 medeia a fusão da membrana viral com a membrana endossomal (4). Ocorre a liberação do nucleocapsídeo e do RNA genômico viral no citoplasma (5). O RNA viral é traduzido, originando proteínas não estruturais (6). As proteínas não estruturais formam o complexo de replicação (7). O complexo de replicação sintetiza um RNA intermediário de fita negativa (8). O RNA subgenômico é traduzido em uma poliproteína estrutural (9a). O RNA genômico associa-se ao capsídeo durante a montagem do nucleocapsídeo (9b). As glicoproteínas virais pE2 e E1 são processadas e maturadas no retículo endoplasmático (10). As glicoproteínas são processadas e maturadas no complexo de Golgi (11). As glicoproteínas são transportadas para a membrana plasmática, onde ocorre a clivagem da pE2 em E2 e E3 (12a). A associação do RNA viral com o capsídeo C e o recrutamento das glicoproteínas permitem a montagem das partículas virais (12b). As partículas virais são liberadas por brotamento, originando vírions maduros (13). Adaptado de (DIAGNE *et al.*, 2020).

Diferentes imagens de microscopia eletrônica de transmissão podem ser observadas na Figura 5, o que vai caracterizar a cronologia dos diferentes estágios da infecção e dos eventos do ciclo de multiplicação do MAYV. É possível identificar a endocitose por meio de clatrina, caracterizado entre 15 e 30 minutos após a adsorção, seguida da replicação do material genético viral entre 2 e 3 horas. Após isso, observa-se a morfogênese às 4 horas pós-infecção (hpi) e a liberação entre 4 e 6 hpi (MENDONÇA *et al.*, 2023).

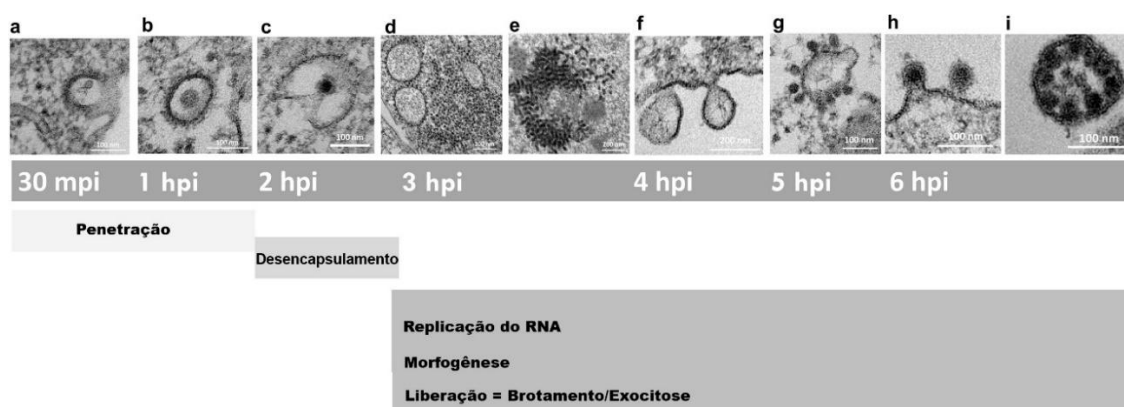


Figura 5 - Cronologia dos eventos do ciclo de multiplicação do MAYV. A cronologia dos eventos do ciclo multiplicação do MAYV é iniciada entre 15 e 30 minutos pós-infecção (mpi) (a), quando ocorre a penetração viral por meio de endocitose mediada por clatrina. Em aproximadamente 1 hora pós-infecção (hpi), as partículas virais encontram-se internalizadas em vesículas celulares (b). A partir de 2 hpi, inicia-se o processo de desnudamento do vírion, concomitantemente ao início da replicação do RNA viral (c). Em torno de 3 hpi, observa-se o começo da morfogênese das partículas, caracterizada pela reorganização dos ribossomos celulares (d) e pela formação das primeiras partículas virais (e). Em 4 hpi, esférulas são identificadas em todas as células analisadas, e as primeiras partículas começam a brotar da célula hospedeira (f). Em 5 hpi, o CPV-II torna-se abundante no citoplasma, acompanhado por um aumento expressivo no número de partículas virais (g). Por volta de 6 hpi, a maioria das partículas é liberada das células, ocorrendo principalmente por brotamento (h) ou por exocitose mediada por vesículas gigantes (i). Adaptado de (MENDONÇA *et al.*, 2023).

1.5 TRANSMISSÃO

As doenças transmitidas por vetores vêm se tornando uma ameaça à saúde global. A Organização Mundial da Saúde (OMS) revela que elas são responsáveis por 17% das doenças infecciosas, que ocasionam cerca de 700.000 mortes todos os anos. O MAYV é um vírus endêmico de regiões tropicais da América Central e do Sul, com maior ocorrência na bacia amazônica,

e tem demonstrado potencial para alcançar e se estabelecer em ambientes urbanos (TORRES *et al.*, 2026).

A transmissão ocorre principalmente através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Haemagogus*, sendo principalmente *Haemagogus janthinomys*, porém pode ser transmitida por outros mosquitos, tais como os dos gêneros *Culex*, *Mansonia*, *Aedes*, *Psorophora* e *Sabethes*. O ciclo de transmissão é iniciado após os mosquitos realizarem a alimentação sanguínea em hospedeiros infectados pelo MAYV. Com a ingestão, o MAYV infecta o epitélio do intestino médio do mosquito, realiza a replicação, alcança a hemolinfa e atinge as glândulas salivares, podendo ser transmitido para novos hospedeiros através da picada (CELONE *et al.*, 2020).

A transmissão por mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, caracterizados por serem altamente antropofílicos e por possuírem ampla distribuição em diferentes partes do mundo (Figura 6), acende um alerta, visto que apresentam grande potencial de disseminação, o que pode ser ampliado pelas mudanças de temperatura mundial e pelo aquecimento global. Assim, esses fatores podem potencializar a disseminação do vírus Mayaro (WEI *et al.*, 2024).

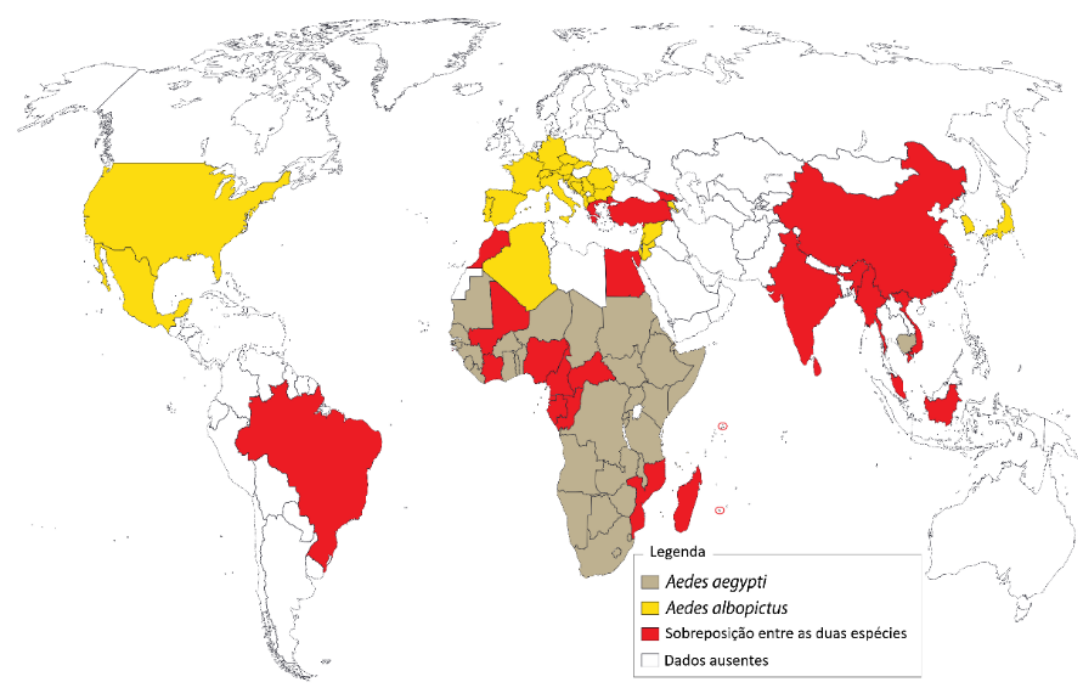


Figura 6 - Distribuição mundial de *ae. Albopictus* e *ae. Aegypti*. Adaptado de (DIAGNE *et al.*, 2020).

1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A infecção pelo MAYV pode se manifestar de forma assintomática ou apresentar um quadro clínico variável, que vai desde manifestações brandas e autolimitadas até complicações graves (DA SILVA *et al.*, 2024). O período de incubação da doença pode variar geralmente entre 7 a 12 dias (YADAV *et al.*, 2022). De início, as manifestações clínicas apresentam-se como um quadro febril agudo de começo súbito, seguido por cefaleia intensa, mialgia e dor retro-orbital (TORRES *et al.*, 2026). É comum observar o aparecimento de exantema maculopapular, que normalmente surge entre o quinto e o sétimo dia após o início dos sintomas (DA SILVA *et al.*, 2024).

A artralgia constitui a manifestação clínica mais característica da infecção, apresentando-se geralmente de forma simétrica e acometendo principalmente articulações periféricas, como as das mãos e dos pés. Em mais de 50% dos pacientes, a dor articular pode persistir por meses, evoluindo para uma fase crônica que pode se tornar incapacitante (TORRES *et al.*, 2026). Diversos sintomas associados à infecção pelo MAYV apresentam semelhança com

aqueles observados em outros alfavírus artritogênicos, como o CHIKV (Figura 7) (WEI *et al.*, 2024).

Embora a maioria dos pacientes se recupere sem sequelas, existe um alerta para a ocorrência de complicações mais severas, incluindo miocardite e manifestações neurológicas (DA SILVA *et al.*, 2024). Além disso, o vírus Mayaro apresenta um risco com potencial epidêmico, em razão de assemelhar-se à apresentação clínica de outros arbovírus e apresentar limitações de ferramentas para seu diagnóstico (TORRES *et al.*, 2026).

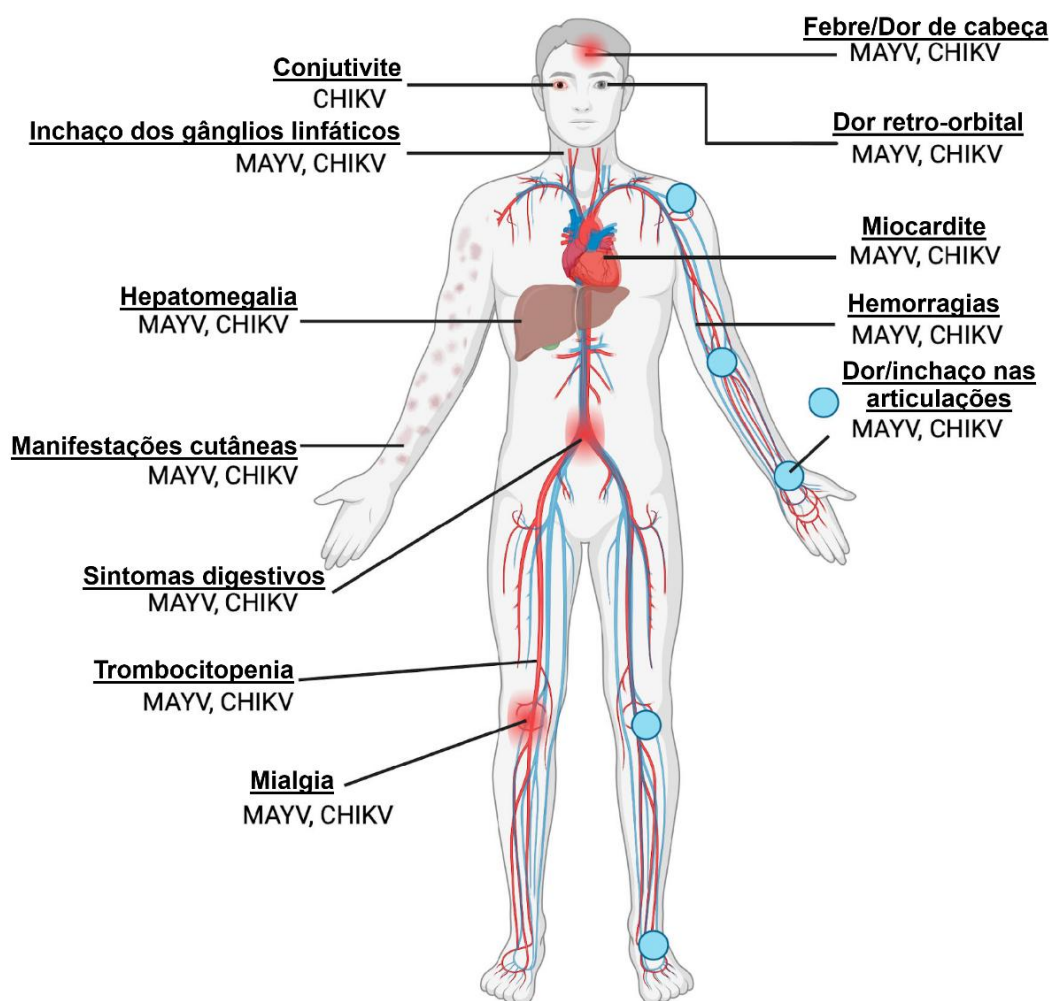


Figura 7 - Os sintomas da infecção por MAYV e CHIKV são mostrados. Adaptado de (WEI *et al.*, 2024).

1.7 TROPISMO CELULAR E TECIDUAL DO MAYV

O MAYV é um alfavírus que apresenta tropismo marcante pelo sistema musculoesquelético em modelos animais (SANTOS *et al.*, 2019). A infecção em camundongos Balb/c pode resultar em alterações patológicas graves, incluindo miosite, artrite, tenossinovite e periostite. O vírus replica-se extensivamente em articulações periféricas, incluindo pulsos e tornozelos, mimetizando a poliartralgia humana (SANTOS *et al.*, 2019). Partículas virais são frequentemente detectadas em tecidos associados à pata e nas fibras musculares do quadríceps (MOTA *et al.*, 2020). O dano musculoesquelético constitui uma característica central da patogênese, sendo evidenciado por inflamação articular e tendinite em modelos de camundongos selvagens (ABBO *et al.*, 2023).

Durante a infecção pelo MAYV, o fígado pode ser afetado, atuando como possível local de replicação viral e apresentando alterações patológicas. A replicação viral no parênquima hepático pode provocar danos ao tecido, caracterizados pela presença de infiltrado de células inflamatórias e aumento do estresse oxidativo (DA SILVA CAETANO *et al.*, 2019). Altas cargas virais podem ser detectadas no tecido hepático já nos estágios iniciais da infecção em modelos imunocompetentes. Além do fígado, partículas virais e RNA genômico também são encontrados no baço, coração e rins após a disseminação do vírus pela corrente sanguínea (BENGUE *et al.*, 2021).

Além disso, o MAYV tem sido associado a complicações neurológicas relevantes, como a meningoencefalite. Embora, por um longo período, seu neurotropismo não tenha sido claramente estabelecido, evidências mais recentes demonstram que o vírus é capaz de infectar e se replicar em astrócitos humanos, apoiando uma replicação viral produtiva e eficiente. Logo, esses achados sugerem um possível envolvimento do sistema nervoso central, ainda não completamente elucidado (GEDDES *et al.*, 2021). Também, sabe-se que as células progenitoras neurais humanas (hNPCs) são consideradas altamente suscetíveis à infecção por esse alfavírus (BENGUE *et al.*, 2021). Estudos com a linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) demonstram alta

suscetibilidade à infecção pelo MAYV, com redução da viabilidade celular e efeito citopático evidente. O vírus replica-se de forma eficiente, independentemente do estado de diferenciação, resultando em elevada produção viral e expressão das proteínas E1 e nsP1 (VALDÉS TORRES, 2025).

1.8 ALFAVÍRUS E SUA INTERAÇÃO COM O SISTEMA IMUNOLÓGICO

A resposta imune inata à infecção por alfavírus apresenta diferentes etapas essenciais, sendo inicialmente o reconhecimento dos componentes dos vírus através de receptores de reconhecimento de padrões, produção de interferon e diferentes citocinas pró-inflamatórias, e ativação e mobilização de células do sistema imune. A compreensão da resposta imune durante a infecção por alfavírus, permite elaborar novas abordagens terapêuticas para auxiliar no controle e reduzir os efeitos desses vírus (DE OLIVEIRA SOUZA *et al.*, 2024).

A via do Interferon Tipo I (IFN-I) é a base da resposta antiviral inata, sendo fundamental para a defesa antiviral. Logo, a ativação dos receptores de reconhecimento de patógenos do sistema imune inato converge para a indução de interferons do tipo I (IFN- α/β), que, em sequência, atuam de forma autócrina e parácrina para estabelecer um estado antiviral na célula (FEYZI *et al.*, 2026).

A imunidade adaptativa desempenha um papel fundamental na resposta imunológica contra a eliminação viral, além de realizar a formação de memória imunológica, sendo orquestrada pela ação em conjunto de linfócitos T e B. As células auxiliares T CD4⁺ organizam a resposta imune antiviral ao mandar sinais fundamentais para a ativação e o funcionamento coordenado de diferentes populações celulares, como as células B e as T CD8⁺. Por outro lado, as células T CD8⁺ desempenham atividade citotóxica direta contra as células que estão infectadas, por meio da liberação de perforina e granzimas, que induzem a apoptose das células infectadas, o que é fundamental para limitar a replicação e a disseminação do vírus no hospedeiro (DE OLIVEIRA SOUZA *et al.*, 2024).

As células T reguladoras (Tregs, CD4⁺FoxP3⁺), por sua vez, modulam respostas inflamatórias, produzindo citocinas como IL-10 e TGF- β , sendo fundamentais para evitar imunopatologia durante infecções por alphavírus, como MAYV e CHIKV (KAFAI *et al.*, 2022).

Já as células B, especialmente as maduras (B220⁺IgM⁺), são responsáveis pela produção de anticorpos neutralizantes, promovendo uma resposta que é geralmente protetora, mas que, quando exacerbada, pode contribuir para inflamação crônica e agravar a patologia viral (KAFAI *et al.* 2022; DE OLIVEIRA SOUZA *et al.*, 2024).

Em infecções por MAYV e CHIKV, tanto a ativação de células T e B quanto o equilíbrio entre efetores e reguladores determinam o desfecho clínico, ressaltando a importância da modulação dessas subpopulações para controle da infecção e redução do dano tecidual (WEBER *et al.*, 2023).

1.9 ANTIVIRAIS

As infecções virais representam uma ameaça constante à saúde pública e à estabilidade econômica mundial, sendo responsáveis por milhões de mortes todos os anos (DELSHADI *et al.*, 2021; ANDERSEN *et al.*, 2020). Historicamente, o desenvolvimento dos antivirais teve um marco importante em 1963, com a aprovação da idoxuridina, sendo o primeiro fármaco antiviral que foi usado para tratar o vírus herpes simplex (HSV), abrindo caminho para o desenvolvimento de terapias específicas contra infecções virais (KAUSAR *et al.*, 2021). O desenvolvimento de antivirais foi, durante muito tempo, direcionado para fármacos específicos contra vírus individuais. No entanto, estratégias mais recentes têm buscado substâncias capazes de atuar em alvos virais conservados ou em fatores da célula hospedeira utilizados por diferentes vírus, possibilitando atividade antiviral contra múltiplas famílias virais (ADAMSON *et al.*, 2021).

Diferentemente dos antibióticos, que geralmente buscam eliminar o patógeno, os antivirais atuam principalmente na inibição de etapas importantes do ciclo de multiplicação viral, com o objetivo de impedir a replicação do vírus. Essas estratégias incluem desde o bloqueio da adsorção e da entrada viral na célula hospedeira até a inibição da síntese de ácidos nucleicos, por meio de análogos de nucleosídeos e inibidores de polimerases (KAUSAR *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2021). Além dessas abordagens mais clássicas, os antivirais também podem atuar na diminuição da disseminação viral por diferentes mecanismos de

ação farmacológica. Para o vírus influenza, os inibidores da neuraminidase atuam bloqueando a ação dessa enzima, o que impede que novas partículas virais sejam liberadas pelas células hospedeiras e reduz a disseminação da infecção. De maneira semelhante, compostos naturais, como a 1-desoxinojirimicina provenientes de *Bombyx mori*, demonstraram a capacidade para interferir na maturação das partículas do vírus da hepatite B, diminuindo então sua competência de infectar as células. Tais mecanismos observados tanto em antivirais sintéticos quanto em produtos naturais, demonstram as diferentes abordagens que permitem restringir a propagação viral no organismo. (KUMARI *et al.*, 2023; MUSARRA-PIZZO *et al.*, 2021)

Embora muitas pesquisas tenham levado ao desenvolvimento de antivirais, faz-se muito importante a descoberta de novas terapias, vista a elevada capacidade de mutação dos vírus de RNA. Logo, essas alterações favorecem o surgimento de variantes capazes de reduzir a eficácia de vacinas e antivirais já existentes. Além disso, diferenças estruturais e nos ciclos de multiplicação entre os vírus dificultam o desenvolvimento de antivirais duradouros e com amplo espectro de ação (KUMARI *et al.*, 2023; MUSARRA-PIZZO *et al.*, 2021). Adicionalmente, a necessidade de utilização da maquinaria metabólica das células hospedeiras dificulta o desenvolvimento de antivirais com toxicidade seletiva, o que frequentemente está associado à ocorrência de efeitos adversos significativos (KUMAR *et al.*, 2020).

Visto que atualmente não existem vacinas ou terapias antivirais disponíveis para o tratamento ou prevenção do MAYV, é de grande importância a busca por novas terapias antivirais que apresentem baixa citotoxicidade e potente atividade antiviral (CORRÊA-AMORIM *et al.*, 2026).

1.10 ALGA *Dictyota menstrualis*

O ambiente marinho apresenta uma grande diversidade química e biológica e representa um recurso excepcional para a identificação de novas moléculas com importante atividade biológica. Os organismos marinhos possuem composições químicas que são estudadas em diversas áreas, tais como: produtos naturais, quimiotaxonomia e ecologia química, incluindo a análise de seus papéis ecológicos e biológicos. As algas marinhas são caracterizadas pela produção de uma variedade de metabólitos secundários, com um amplo espectro de bioatividade (OBANDO *et al.*, 2022).

A família Dictyotaceae reúne aproximadamente 349 espécies de algas, subdivididas em 19 gêneros, sendo considerada um dos grupos mais representativos da classe Phaeophyceae. Grande parte das espécies (cerca de 64%) pertence aos gêneros Dictyota, Lobophora e Padina, encontrados principalmente em mares tropicais e subtropicais. O gênero Dictyota engloba cerca de 97 espécies, distribuídas majoritariamente em mares tropicais e temperados quentes, tendo sua abundância variada de acordo com fatores bióticos e abióticos, como temperatura, luminosidade e concentração de nutrientes. Além disso, espécies do gênero Dictyota têm demonstrado importantes propriedades farmacológicas, incluindo atividades antivirais, antibacterianas, antitumorais, anti-inflamatórias e antioxidantes. (DOS SANTOS *et al.*, 2024).

A alga marinha *Dictyota menstrualis* (Hoyt) Schnetter, Hörnig & Weber-Peukert é rica em diterpenos, principalmente guaianos prenilados, cicloxenianos e dicotomanos. Esses compostos são classificados em dois grupos distintos: o tipo germacrânico prenilado (Grupo I) e o tipo xeniano (Grupo III). Os diterpenos apresentam diferentes atividades farmacológicas *in vitro*, incluindo atividade antiviral contra HIV-1 e HSV-1, além de efeitos anticoagulantes e sobre a agregação plaquetária (OBANDO *et al.*, 2025).

Além disso, a alga *D. menstrualis* é encontrada em quase toda a costa brasileira, em cerca de 8.000 km, bem como no Caribe e no México. A sua grande distribuição territorial e a elevada produção de biomassa fazem com que esses organismos sejam altamente promissores para a prospecção de compostos bioativos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Apesar do seu potencial terapêutico, a alga *D. menstrualis* também é utilizada em estudos como matéria-prima central por apresentar rápido crescimento e alto teor de alginato em sua composição. Logo, sua biomassa fornece um polímero de alta qualidade para a fabricação inovadora de bioaerogéis isolantes térmicos, sendo uma opção verde e sustentável capaz de substituir materiais sintéticos convencionais na ciência dos materiais (HPS *et al.*, 2024).

Sendo assim, com suas diversas aplicações, a alga *D. menstrualis* se torna uma promissora candidata para futuros estudos e testes de atividade biológica, assim como já demonstrado para os arbovírus CHIKV e ZIKV (CIRNE-SANTOS *et al.*, 2019; CIRNE-SANTOS *et al.*, 2020).

2 OBJETIVOS

2.10 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral e imunomoduladora de frações obtidas da alga *Dictyota menstrualis* contra ao vírus Mayaro.

2.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade antiviral das frações de *D. menstrualis* em células Vero.
2. Determinar a concentração da fração da alga mais promissora capaz de inibir em 50% da replicação viral (EC_{50}).
3. Avaliar a atividade antiviral da fração da alga *D. menstrualis* em cultura de neurônios.
4. Avaliar a atividade virucida da fração da alga *D. menstrualis* em células VERO infectadas.
5. Avaliar a inibição da Adsorção da fração da alga *D. menstrualis* em células VERO infectadas.
6. Avaliar a eficácia terapêutica da fração mais promissora da alga *D. menstrualis* em camundongos BALB/c fêmeas infectadas.
7. Analisar as populações de linfócitos no baço e nos linfonodos inguinais dos camundongos tratados com a fração da alga *D. menstrualis* e infectados com MAYV por citometria de fluxo.
8. Analisar possíveis alterações histopatológicas causadas pelo MAYV nos músculos da pata após o período de tratamento de 14 dias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SUBSTÂNCIAS, CÉLULAS E VÍRUS

As frações da alga *D. menstrualis* foram cedidas pelas professoras Diana Cavalcanti e Valéria Teixeira, do Laboratório de Produtos Naturais de Algas Marinhas (ALGAMAR) da Universidade Federal Fluminense. Foram testadas 4 substâncias ricas em diterpenos, sendo o extrato bruto (EBDM) e 3 frações acetiladas, FAC-1, FAC-2 e FAC-3, que foram obtidas de acordo com a metodologia já descrita pelo nosso grupo (CIRNE-SANTOS *et al.*, 2020).

Foram utilizadas culturas de neurônios de embrião de galinha (DOS SANTOS-RODRIGUES *et al.*, 2015). As culturas mistas de neurônios foram cedidas pelo professor Alexandre Rodrigues do Departamento de Neurobiologia da Universidade Federal Fluminense, onde foram disponibilizadas e preparadas em placas de 24 poços.

As células Vero foram cultivadas em garrafa estéril de poliestireno com capacidade de 25 cm² e em placas de 24 poços contendo o meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino, 2 mmol de L - 1 L-glutamina e 50 unidades/ ml de penicilina e estreptomicina. As garrafas foram incubadas em uma estufa umidificada, à temperatura de 37°C e numa atmosfera 5% de CO₂.

O vírus MAYV (ATCC VR 66) foi amplificado em células VERO.

3.2. ENSAIOS *IN VITRO*

3.2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES DA ALGA *D. Menstrualis* EM CÉLULAS VERO

Foi realizado em triplicata o teste de triagem antiviral em células Vero (2 × 10⁴) cultivadas em microplacas de 24 poços inoculadas com MAYV (10⁶

PFU/mL), em condições correspondentes a um MOI de 0,1. Foram testados três frações e o extrato bruto da alga. Estabeleceram-se três tratamentos experimentais: controle celular (células não infectadas e não tratadas), controle DMSO 1% (células infectadas e tratadas com DMSO 1%) e controle tratado (células infectadas tratadas com 20 µg/mL das substâncias da alga).

Vale ressaltar que a concentração de 20 µg/mL é frequentemente utilizada em ensaios antivirais iniciais (DE CASTRO BARBOSA *et al.*, 2022) , pois permite observar efeitos biológicos sem ultrapassar limites de toxicidade celular (NINLAOR *et al.*, 2025).

Após 2 h de adsorção do vírus a 37 °C em 5% de CO₂, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas para remoção das partículas virais não aderentes, seguido da adição de 20 µg/mL das diferentes frações da alga, a fim de identificar sua capacidade de inibir a replicação do MAYV. Em seguida, as placas infectadas e tratadas com as substâncias foram cobertas com carboximetilcelulose (CMC) a 3% e incubadas nas condições do ensaio em placa (CIRNE-SANTOS *et al.*, 2020) de 48 a 72 h a 37 °C em 5% de CO₂. A monocamada celular foi então fixada com formalina a 10% e corada com cristal violeta a 1%, e a inibição foi determinada pela contagem de PFU (Unidade Formadora de Placa) sendo comparado a inibição entre os tratamentos e controles.

A fração que apresentou maior atividade antiviral (superior a 90%) na concentração de 20 µg/mL foi selecionada para determinação da concentração necessária para reduzir em 50% o número de placas virais (EC₅₀), sendo testada nas concentrações de 0,65; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg/mL, seguindo os mesmos procedimentos metodológicos descritos anteriormente para a triagem antiviral, em triplicata.

3.2.2. AVALIAR A ATIVIDADE ANTIVIRAL DA FRAÇÃO DA ALGA *D. menstrualis* EM CULTURA DE NEURÔNIOS

Os neurônios foram cultivados em placas de 24 poços e posteriormente infectados com o vírus (MOI de 1) na ausência ou presença de diferentes concentrações da fração (2,5; 5; 10; 20 µg/mL). Para os experimentos, foram incluídos o controle celular (células não infectadas e não tratadas), um controle viral (células infectadas e não tratadas) e células tratadas (células infectadas tratadas com as diferentes concentrações das frações da alga). Após 1 h de adsorção a 37 °C, o inóculo residual foi substituído por DMEM contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e a dose correspondente de cada substância. Os neurônios foram incubados por 48 ou 72 h, sendo avaliados diariamente quanto aos efeitos citopáticos e alterações morfológicas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.3. AVALIAR A ATIVIDADE VIRUCIDA DA FRAÇÃO DA ALGA *D. menstrualis* EM CÉLULAS VERO INFECTADAS.

Para avaliar se a fração apresenta atividade virucida como possível mecanismo de ação antiviral, ou seja, se é capaz de inativar diretamente a partícula viral antes da infecção celular, uma suspensão contendo o MAYV (10^7 PFU/mL) foi misturada a volumes iguais das soluções da fração FAC-1. Ao mesmo tempo em que se estabeleceram as concentrações finais de 5, 10 e 20 µg/mL, as amostras foram submetidas a uma diluição de 200 vezes. É importante destacar que a diluição das amostras reduziu, de forma efetiva, a concentração do composto incubado com as células, garantindo que a substância atingisse uma concentração residual inócua, que não deixou que a droga agisse nas células, e sim somente nas partículas virais livres. Essas misturas diluídas foram incubadas por 2 horas a 37 °C, visando permitir a interação direta entre a substância e as partículas virais. O controle DMSO 1% foi submetido às mesmas condições de diluição e incubação, utilizando DMSO 1% no lugar da FAC-1. Após esse período de incubação, as misturas correspondentes ao controle DMSO 1% e aos tratamentos com FAC-1 foram utilizadas para infectar células

Vero cultivadas em placas de 24 poços, em condições correspondentes a um MOI de 0,1. Também foi incluído o controle celular, composto por células não infectadas e não tratadas. As células foram mantidas em contato com as respectivas misturas por 2 horas a 37 °C para adsorção das partículas virais remanescentes, sendo posteriormente lavadas para remoção do excesso de vírus e da substância residual. Em seguida, as células foram cobertas com meio de sobreposição contendo CMC e incubadas sob condições adequadas para a realização do ensaio de redução de placas. Todos os grupos foram realizados em triplicata.

3.2.4. AVALIAR A INIBIÇÃO DA ADSORÇÃO DA FRAÇÃO DA ALGA *D. menstrualis* EM CÉLULAS VERO INFECTADAS.

Monocamadas com 90% de confluência de células Vero cultivadas em placas de 24 poços foram pré-resfriadas a 4 °C por 15 min. Em seguida, as células foram incubadas com diferentes concentrações da fração mais promissora (5, 10 e 20 µg/mL) e infectadas simultaneamente com MAYV (MOI de 1), permanecendo por 2 h a 4 °C para permitir apenas a adsorção viral. Posteriormente, as monocamadas foram lavadas duas vezes com PBS frio para remoção de partículas virais não adsorvidas e incubadas com meio fresco a 37 °C. Para os experimentos, foram incluídos o controle celular (células não infectadas e não tratadas), o controle DMSO 1% (células infectadas e tratadas com DMSO 1%) e os controles tratados (células infectadas na presença de 5, 10 e 20 µg/mL da fração da alga). Após esse período, as células foram cobertas com carboximetilcelulose a 3% e, após 72 h de incubação, o efeito inibitório da fração sobre a ligação do MAYV às células hospedeiras foi avaliado por ensaio de formação de placas virais (PFU).

3.3. ENSAIOS IN VIVO

3.3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas linhagens de camundongos isogênicos BALB/c (fêmeas), adultos (8 semanas), pesando entre 20 e 30 g. Os ensaios foram realizados com fêmeas, visto que a literatura relata diferenças de resposta entre os sexos, sendo as fêmeas, em geral, mais sensíveis a diferentes infecções virais, apresentando maior suscetibilidade e taxa de mortalidade durante quadros virais sistêmicos (Geurs *et al.*, 2012). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF), sob o número 8787011219.

3.3.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DA FRAÇÃO DA ALGA *D. menstrualis* EM CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEAS INFECTADAS.

Camundongos BALB/c fêmeas adultas foram distribuídos em grupos experimentais contendo cinco animais cada. Os animais foram infectados por via subcutânea no coxim plantar da pata traseira direita com 10 µL de MAYV na concentração de 10⁴ PFU/mL. Duas horas após a infecção, os animais foram tratados por via oral, por meio de gavagem (utilizando sonda gástrica), recebendo um volume de 200 µL na dose de 20 mg/kg de DMSO a 1% (veículo), fração FAC-1 e ribavirina, que foi utilizada como controle por apresentar ampla atividade inibitória *in vitro* contra vírus de RNA, incluindo membros dos Alphavirus (GOULD *et al.*, 2010); porém, para o MAYV, essa atividade ainda não está esclarecida na literatura. As administrações foram realizadas diariamente durante 14 dias consecutivos. Também, foram formado um grupo de animais não infectados. Ao longo do período experimental, os animais foram monitorados diariamente quanto ao desenvolvimento de sinais clínicos associados à infecção, incluindo o edema da pata inoculada, avaliado por meio da mensuração com paquímetro digital (Dexter), e as alterações no peso corporal, determinadas por pesagens diárias em balança digital. Ao final dos 14 dias de experimento foi

realizado a eutanásia medicamentosa e coletados os órgãos para as análises histopatológica e citometria de fluxo.

3.3.3. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS NO BAÇO E NOS LINFONODOS DOS CAMUNDONGOS TRATADOS E INFECTADOS COM MAYV.

Os baços e os linfonodos inguinais obtidos no experimento de eficácia terapêutica descritos anteriormente foram utilizados para a análise das populações de linfócitos. Para a marcação de linfócitos B, foram utilizados os anticorpos anti-B220 conjugado à PE (clone RA3-6B2, BioLegend) e anti-IgM FITC (clone II/41, BD Pharmingen). Para a marcação de linfócitos T, foram empregados os anticorpos anti-CD4 PerCP, anti-CD8 FITC e anti-Foxp3 (clone FJK-16s, eBioscience). No caso da marcação de linfócitos T regulatórios, além do anti-Foxp3, foi utilizado o kit de fixação e permeabilização celular (Fix/Perm e Perm Buffer, BD Biosciences).

Após a eutanásia dos animais, os baços e linfonodos inguinais foram dissociados manualmente em placas de Petri contendo meio DMEM, utilizando peneira celular e o êmbolo de uma seringa, para obtenção de uma suspensão celular. Em seguida, foi realizada a contagem de células viáveis na câmara de Neubauer, utilizando azul de Trypan a 0,1%. No caso do baço, antes da contagem, foi feita a lise de hemácias com tampão ACK (amônio-cloreto-potássio) por 2 minutos. Logo após, foi adicionado meio DMEM para interromper a ação do tampão. A suspensão celular foi então centrifugada a 1200 RPM por 6 minutos para formação do pellet. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de meio para posterior contagem na câmara de Neubauer.

A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo ACCURI (BD Pharmingen), e os dados foram analisados utilizando o software BD Accuri C6 Software.

3.3.4. ANÁLISE DE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CAUSADAS PELOS VÍRUS NOS MÚSCULOS DA PATA DOS ANIMAIS.

As análises histopatológicas foram realizadas em parceria com a professora Kissila Rabelo, do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual (LUBT) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os tecidos musculares da pata dos grupos experimentais foram fixados em formalina a 5% e, em seguida, separados e processados no equipamento automatizado Lupetec PT05 (histotécnico). O processamento incluiu as etapas de desidratação, clarificação e banhos de parafina, seguidas da inclusão dos órgãos em blocos de parafina. Posteriormente, foram obtidos cortes histológicos em micrótomo rotativo para a confecção das lâminas, que passaram pela coloração com hematoxilina e eosina (HE), permitindo a visualização de possíveis alterações histopatológicas.

3.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.2. Os dados obtidos nos ensaios in vitro e in vivo foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para avaliar as diferenças entre os grupos experimentais, foi utilizada análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguida dos testes de comparações múltiplas de Dunnett, Tukey ou Bonferroni, de acordo com o delineamento experimental. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com valores de p inferiores a 0,05. Os níveis de significância estatística foram representados por *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIOS *IN VITRO*

4.1.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS FRAÇÕES DA ALGA *D. menstrualis* EM CÉLULAS VERO INFECTADAS

Com o objetivo de selecionar a fração mais promissora para os experimentos *in vivo*, as frações da alga foram submetidas a ensaios de atividade antiviral. Avaliou-se a capacidade de inibir a produção de partículas virais do MAYV na concentração de 20 µg/mL, conforme demonstrado na Tabela 1 e ilustrado na Figura 8. Entre os resultados, a fração FAC-1 apresentou o maior percentual de inibição, atingindo 97% na condição testada. Conforme descritos na literatura, os valores de citotoxicidade (CC₅₀) apresentados na Tabela 1 variaram entre 124 e 984 µM (CIRNE-SANTOS *et al.*, 2020). A análise estatística ANOVA com pós-teste de Dunnett (Figura 9) indicou diferença significativa entre o controle DMSO 1% e todas as frações avaliadas, com FAC-1, FAC-2 e EBDM demonstrando significância estatística (**** $p < 0,0001$), e a FAC-3 com significância estatística ($p < 0,001$).

Tabela 1. Resultados citotoxicidade (CC₅₀), Percentual de Inibição (PI).

Frações da alga <i>D. Menstrualis</i>	*CC ₅₀ (µg/mL)	PI (%)
FAC-1	124	97
FAC-2	482	64
FAC-3	-	15
EBDM	984	32

Legenda: CC₅₀ = concentração citotóxica capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular, expressa em µg/mL; PI = percentual de inibição da replicação viral; EBDM = extrato bruto de *Dictyota menstrualis*; – = não determinado. *(CIRNE-SANTOS *et al.*, 2020)

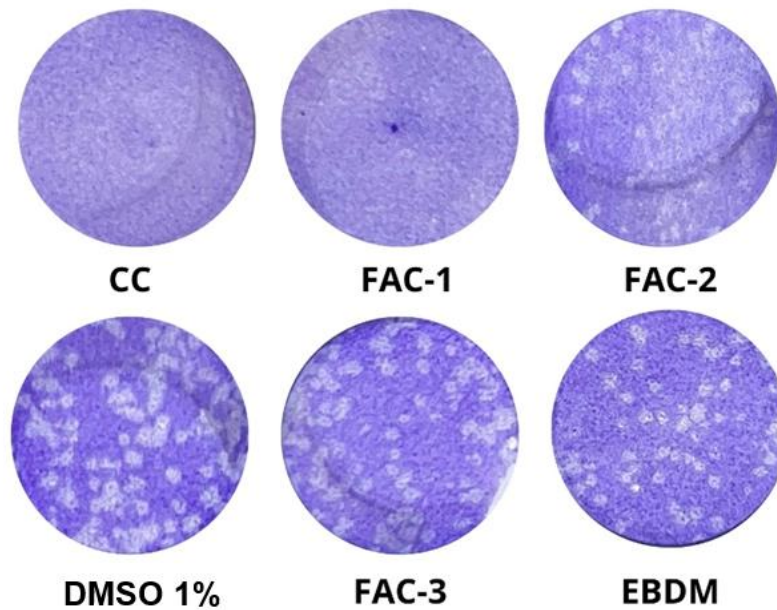


Figura 8. Avaliação do percentual de inibição das frações da alga *d. Menstrualis*. Fotos representativas dos poços corados com cristal violeta, representando o Controle de Células (CC) o Controle DMSO 1% (células infectadas e tratadas com DMSO 1%) e os poços contendo células infectadas com o MAYV e tratadas com 20 µg/mL das diferentes frações da alga (FAC-1; FAC-2; FAC-3 E EBDM – Extrato bruto *D. Menstrulis*). O experimento foi realizado em triplicata.

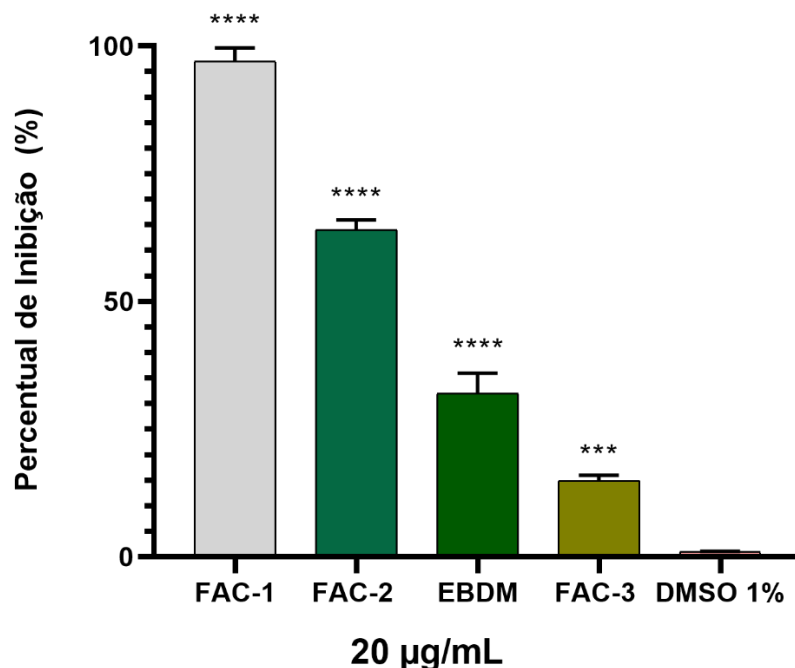


Figura 9. Percentual de inibição do vírus Mayaro pelas frações da alga *D. Menstrualis* (20 µg/ml). Foram avaliadas as frações FAC-1, FAC-2, FAC-3 e EBDM (Extrato bruto da Alga *D. menstrualis*) em comparação ao controle DMSO 1% (células infectadas e tratadas com DMSO 1%). Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n =

3). A análise estatística, realizada por ANOVA com pós-teste de Dunnett, comparou todas as frações com o Controle DMSO 1%. FAC-1, FAC-2 e EBDM apresentaram diferenças significativas (****p < 0,0001), enquanto FAC-3 mostrou diferença significativa (p < 0,001). A FAC-1 apresentou 97% de inibição na concentração de 20 µg/mL, sendo a mais promissora no teste.

A fração FAC-1 foi submetida ao ensaio para determinar a concentração capaz de inibir em 50% a produção de partículas virais (EC₅₀). Os resultados demonstraram que a inibição do MAYV ocorreu de maneira dose-dependente (Tabela 2), apresentando valor de EC₅₀ de 4,1 µg/mL. Foi observado um aumento da inibição viral nas maiores concentrações testadas, atingindo aproximadamente 97% na concentração de 20 µg/mL, 81% na concentração de 10 µg/mL e 68% na concentração de 5 µg/mL, reduzindo progressivamente até cerca de 8% na concentração de 0,625 µg/mL (Figura 10).

Tabela 2. Efeito dose-dependente do composto FAC-1 sobre a inibição da produção de partículas virais de MAYV e determinação do EC₅₀.

FAC-1 (µg/mL)	INIBIÇÃO %
20	97
10	81
5	68
2.5	15
1.25	12
0.625	8
EC ₅₀ = 4,1 µg/mL	

Legenda: EC₅₀ = concentração efetiva capaz de inibir em 50% a produção de partículas virais, expressa em µg/mL; FAC-1 = fração ativa isolada; valores de inibição (%) indicam o efeito dose-dependente sobre a replicação do MAYV.

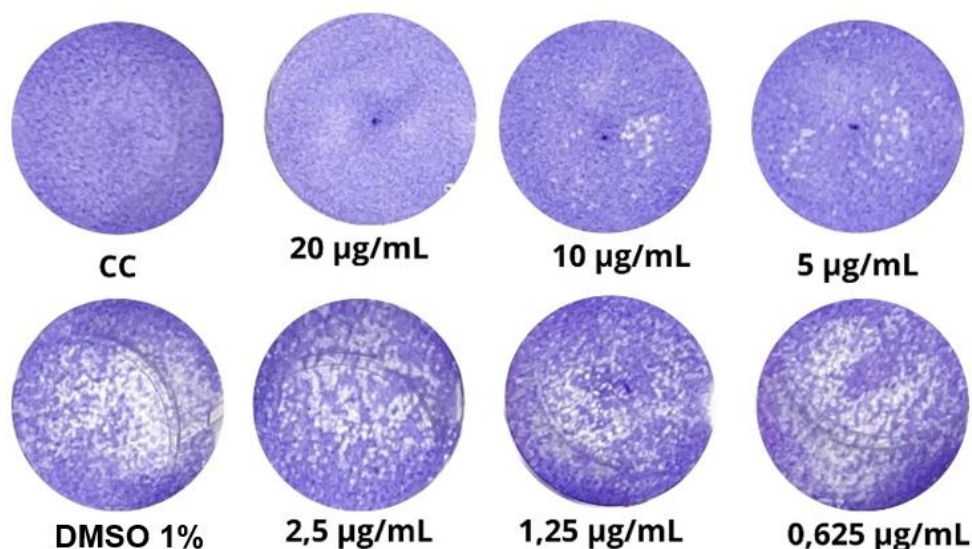


Figura 10. Avaliação do perfil ANTI-MAYV (EC50) em células Vero. A figura acima representa a fotografia dos poços corados com cristal violeta, incluindo o Controle de Células (CC.) o Controle DMSO 1% (células infectadas e tratadas com DMSO 1%) e os poços com células infectadas pelo MAYV e tratadas com diferentes concentrações da fração FAC-1 (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg/mL). O experimento foi realizado em triplicata.

A análise estatística realizada por One-way ANOVA demonstrou diferença significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,0001$) (Figura 11). O pós-teste de Dunnett revelou que todas as concentrações avaliadas apresentaram inibição significativamente superior em relação ao controle DMSO 1%. As concentrações de 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 µg/mL apresentaram alta significância estatística ($****p < 0,0001$), enquanto a concentração de 0,625 µg/mL também demonstrou diferença significativa ($***p < 0,001$). Esses resultados evidenciam relevante atividade antiviral da fração FAC-1, de forma dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração, maior era a inibição do MAYV.

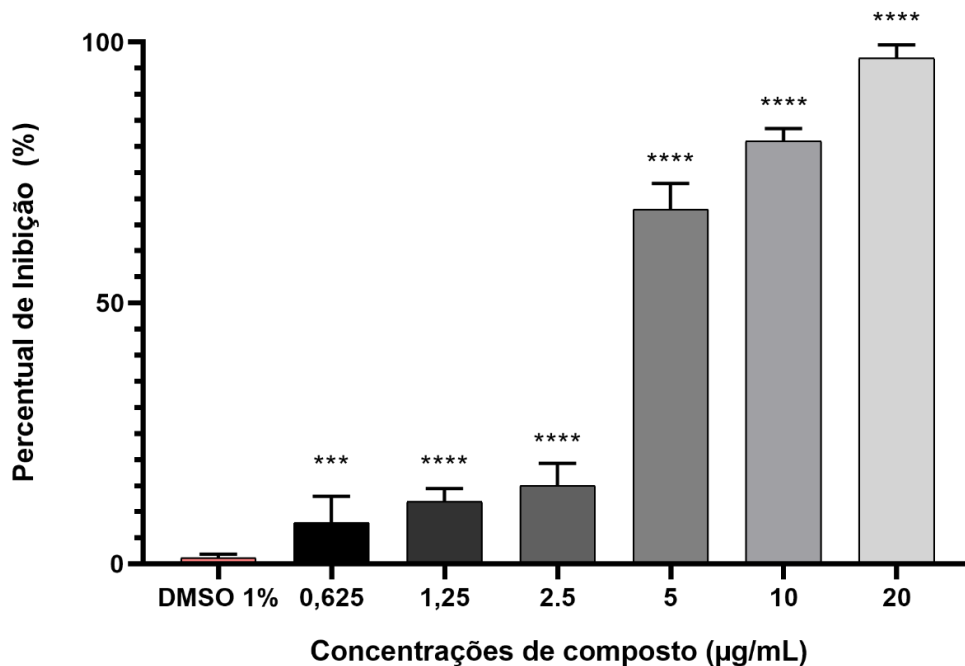
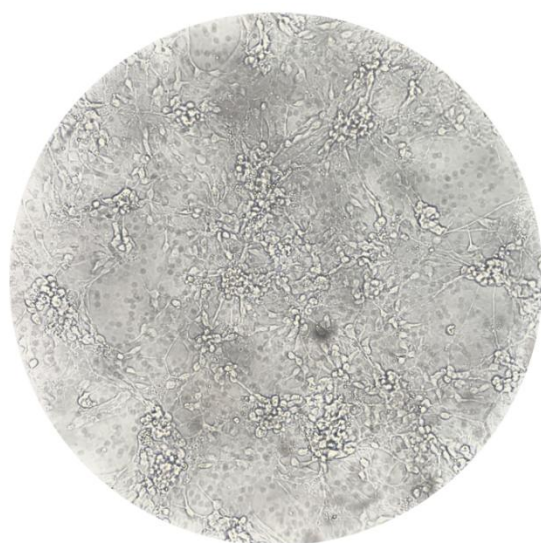


Figura 11. Avaliação da atividade ANTI-MAYV da FRAÇÃO FAC-1 em diferentes concentrações em células Vero. A fração FAC-1 foi avaliada em diferentes concentrações para determinação da concentração capaz de inibir em 50% a replicação viral (EC_{50}). Os resultados demonstraram inibição dose-dependente do MAYV, com EC_{50} de 4,1 µg/mL. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística, realizada por ANOVA com pós-teste de Dunnett, comparou todas as frações com o controle DMSO 1%. Observou-se maior percentual de inibição nas concentrações mais elevadas, atingindo cerca de 97% em 20 µg/mL. A análise estatística foi realizada por One-way ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett. Os valores de significância estão representados como *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em comparação ao controle DMSO 1%.

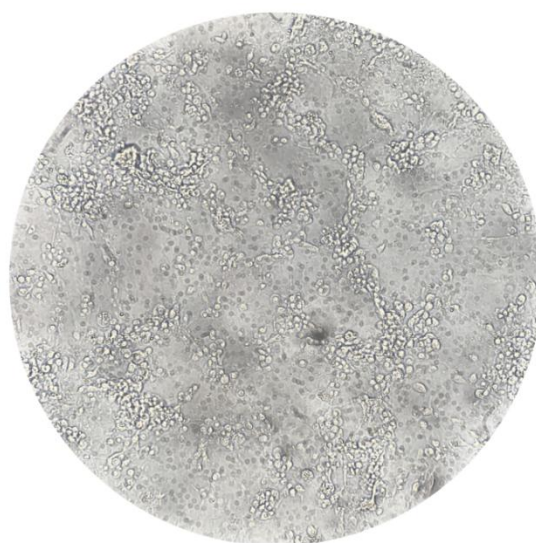
4.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES DA *ALGA D. menstrualis* EM CULTURA DE NEURÔNIOS.

Nos poços do controle de células, é possível observar neurônios com morfologia normal, apresentando estrutura preservada, com prolongamentos e integridade após 72 h de experimento. Já nos poços do controle de vírus, é possível identificar perda da morfologia, com visível efeito citopático provocado pela infecção viral, com células abauladas e perda dos prolongamentos celulares. Na avaliação da atividade antiviral da fração FAC-1, nos poços infectados e tratados com 20 µg/mL e 10 µg/mL da alga, observa-se que essas concentrações foram capazes de manter a morfologia e a integridade dos neurônios. Entretanto, na concentração de 20 µg/mL foi observado maior número

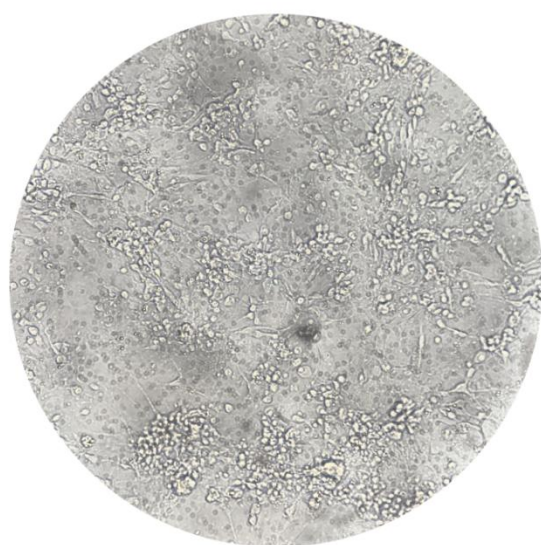
de células viáveis, semelhante ao controle de células. Nos neurônios infectados e tratados com a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, houve baixa inibição, sendo possível observar menor número de células viáveis e perda da morfologia neuronal (Figura 12). Dessa forma, a fração FAc-1 demonstrou potencial na redução do efeito citopático viral, promovendo inibição de forma dose-dependente, com maior evidência na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, mantendo preservada a estrutura dos neurônios após 72 horas de infecção.



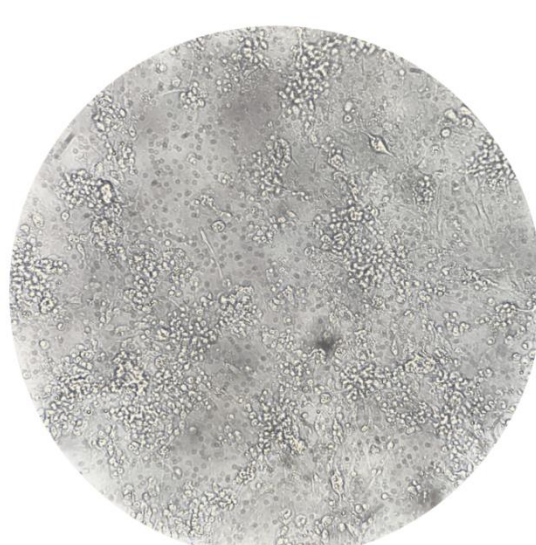
CC



CV



20 $\mu\text{g/mL}$



10 $\mu\text{g/mL}$

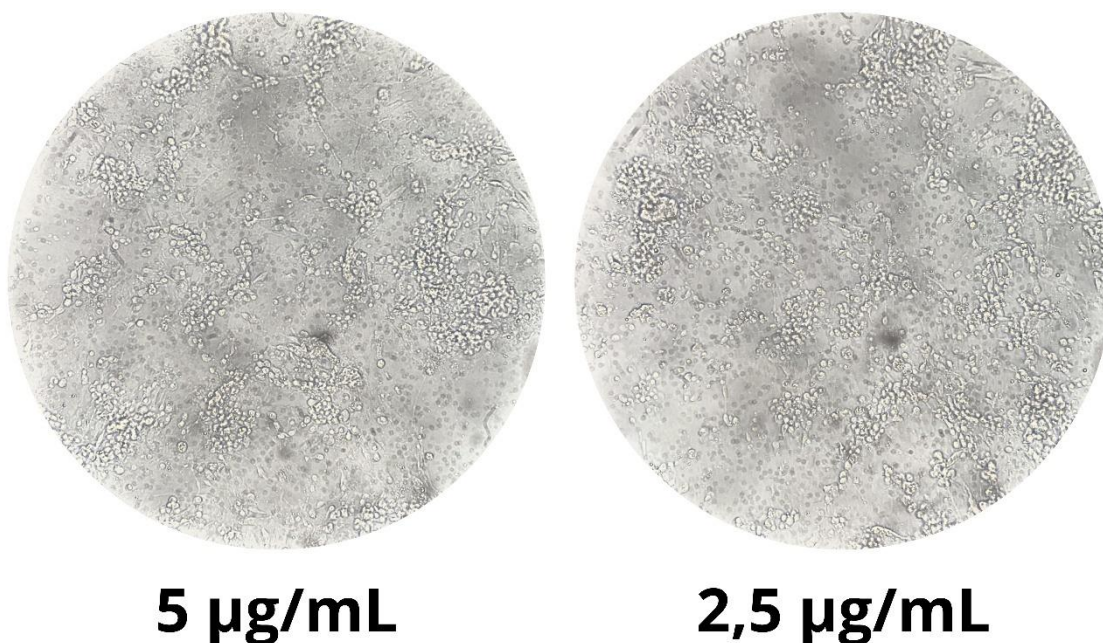


Figura 12. Avaliação da atividade antiviral da FAC-1 em cultura de neurônios. Na imagem, observamos o Controle de Células (CC) o Controle de vírus (CV) e as células infectadas com o MAYV e tratadas com as concentrações 2,5; 5; 10; 20 µg/mL da alga FAC-1. Aumento de 400x. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.1.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA DA FRAÇÃO DA ALGA *D. menstrualis* EM CÉLULAS VERO INFECTADAS.

No ensaio virucida, a fração FAC-1 apresentou efeito sobre as partículas virais do MAYV, promovendo 28% de inibição da infectividade viral na concentração de 20 µg/mL (Figura 13), 12% na concentração de 10 µg/mL e 5% na concentração de 5 µg/mL. A análise estatística revelou diferenças significativas entre os grupos tratados com 20 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL. Logo, o teste de comparações múltiplas de Dunnett indicou que todas as concentrações testadas diferiram significativamente do controle DMSO 1%, evidenciando um efeito dependente da concentração: 5 µg/mL ($p < 0,05$), 10 µg/mL ($p < 0,001$) e 20 µg/mL ($p < 0,0001$).

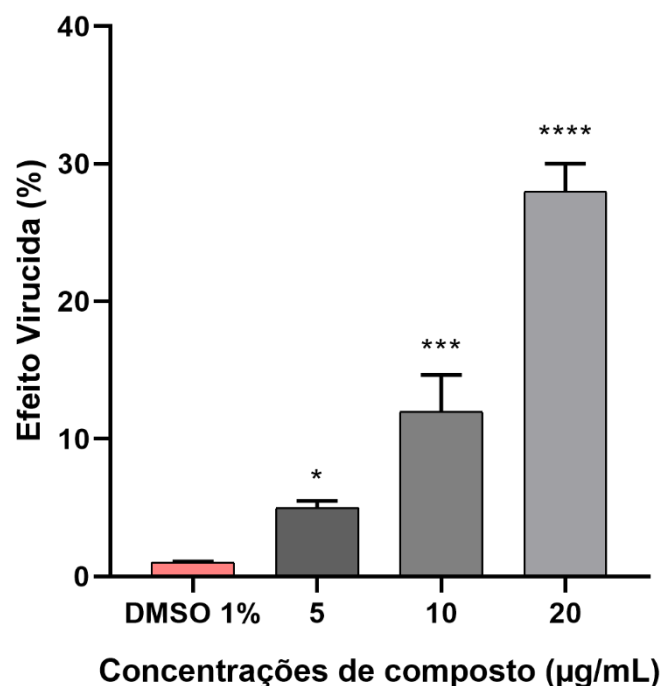


Figura 13. Atividade virucida da fração FAC-1 contra o MAYV em diferentes concentrações. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). A fração FAC-1 promoveu aproximadamente 28% de inibição da infectividade viral na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, 12% em 10 $\mu\text{g/mL}$ e 5% em 5 $\mu\text{g/mL}$. A análise estatística por ANOVA de uma via revelou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,0001$). O teste de comparações múltiplas de Dunnett indicou que as concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ (*), 10 $\mu\text{g/mL}$ (***) e 20 $\mu\text{g/mL}$ (****) diferiram significativamente do controle DMSO 1%.

4.1.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ADSORÇÃO DA FRAÇÃO DA ALGA *D. menstrualis* EM CÉLULAS VERO INFECTADAS.

No experimento de adsorção, que busca entender se a substância atua no bloqueio da ligação do vírus aos receptores das células Vero, a FAC-1 demonstrou forte efeito em impedir a ligação e a entrada das partículas do MAYV, atingindo aproximadamente 81% de inibição na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, 39% de inibição na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 21% de inibição na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ da alga (Figura 14). A análise estatística ANOVA de uma via apresentou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,0001$). O teste de comparações múltiplas de Dunnett demonstrou que todas as concentrações testadas apresentaram diferença significativa em

comparação ao controle DMSO 1% ($p < 0,0001$), indicando redução expressiva da adsorção viral mesmo nas menores concentrações avaliadas. Esses resultados demonstram a capacidade da FAC-1 de interferir em uma das etapas mais importantes do ciclo de infecção, que é a entrada do vírus na célula hospedeira, sugerindo como principal mecanismo de ação a interferência direta na interação vírus–célula.

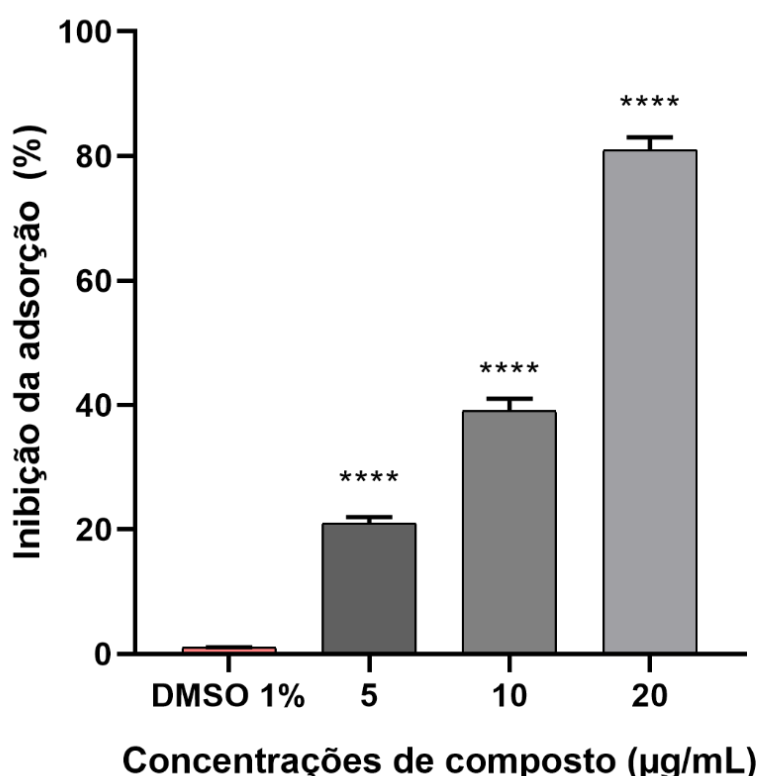


Figura 14. Efeito da fração FAC-1 na adsorção do MAYV em células Vero. A FAC-1 reduziu significativamente a ligação viral em todas as concentrações testadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett, com diferenças em relação ao controle indicadas por **** $p < 0,0001$.

4.2 ANÁLISE DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA

Durante o experimento de eficácia terapêutica, foram separados quatro grupos experimentais de camundongos BALB/c fêmeas: um grupo controle não infectado e três grupos infectados, sendo cada um tratado com DMSO a 1%, ribavirina ou com a fração FAC-1. Cada grupo foi composto por cinco animais (N

= 5). A infecção foi realizada por meio de inoculação subcutânea de 10 µL do MAYV, na concentração de 10⁴ PFU/mL, aplicada no coxim plantar da pata traseira direita dos animais. O tratamento foi iniciado duas horas após a infecção, com administração oral de 20 mg/kg por gavagem, mantida diariamente durante 14 dias consecutivos (Figura 15). Ao longo do experimento, foram acompanhados sinais clínicos, e não houve alteração nem morte dos animais entre os grupos. Também, foram analisados o desenvolvimento de edema nas patas (Figura 15 e 16) e variações no peso corporal dos animais (Figura 17).

4.2.1 INCHAÇO DA PATA

Durante o ensaio de eficácia terapêutica, o inchaço da pata foi monitorado e os dados foram analisados por meio do teste ANOVA, com comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Considerou-se como dia 0 o momento da infecção, sendo o dia 1 correspondente a 24 horas pós-infecção (hpi). Na avaliação da progressão do edema nas patas dos camundongos infectados, o teste estatístico ANOVA evidenciou diferenças significativas entre os grupos ao longo do período analisado.

No primeiro dia pós-infecção (1º DPI), observou-se que o grupo controle não infectado apresentou apenas discreto aumento no volume da pata, contudo, diferenças estatisticamente foram identificadas entre este e os grupos infectados tratados com DMSO a 1%, ribavirina e a fração FAC-1. A partir do 2º DPI, o grupo infectado e tratado com DMSO 1% demonstrou aumento significativo no edema em comparação ao grupo controle não infectado, padrão este que se manteve até o final do experimento, indicando um possível processo inflamatório persistente, provavelmente associado à infecção viral.

O grupo tratado com ribavirina apresentou aumento gradual do edema entre os dias 1 e 7 pós-infecção, seguido de regressão a partir do 8º dia. Na figura 16A e 16B é possível observar a diferença do edema na pata durante o dia 8 e 13 pós a infecção. Por sua vez, os animais que receberam o tratamento da fração FAC-1 exibiram aumento do volume da pata entre os dias 1 e 4 pós-infecção,

com início da redução do edema já no 5º DPI (Figura 15), mantendo a redução do inchaço até o final do experimento.

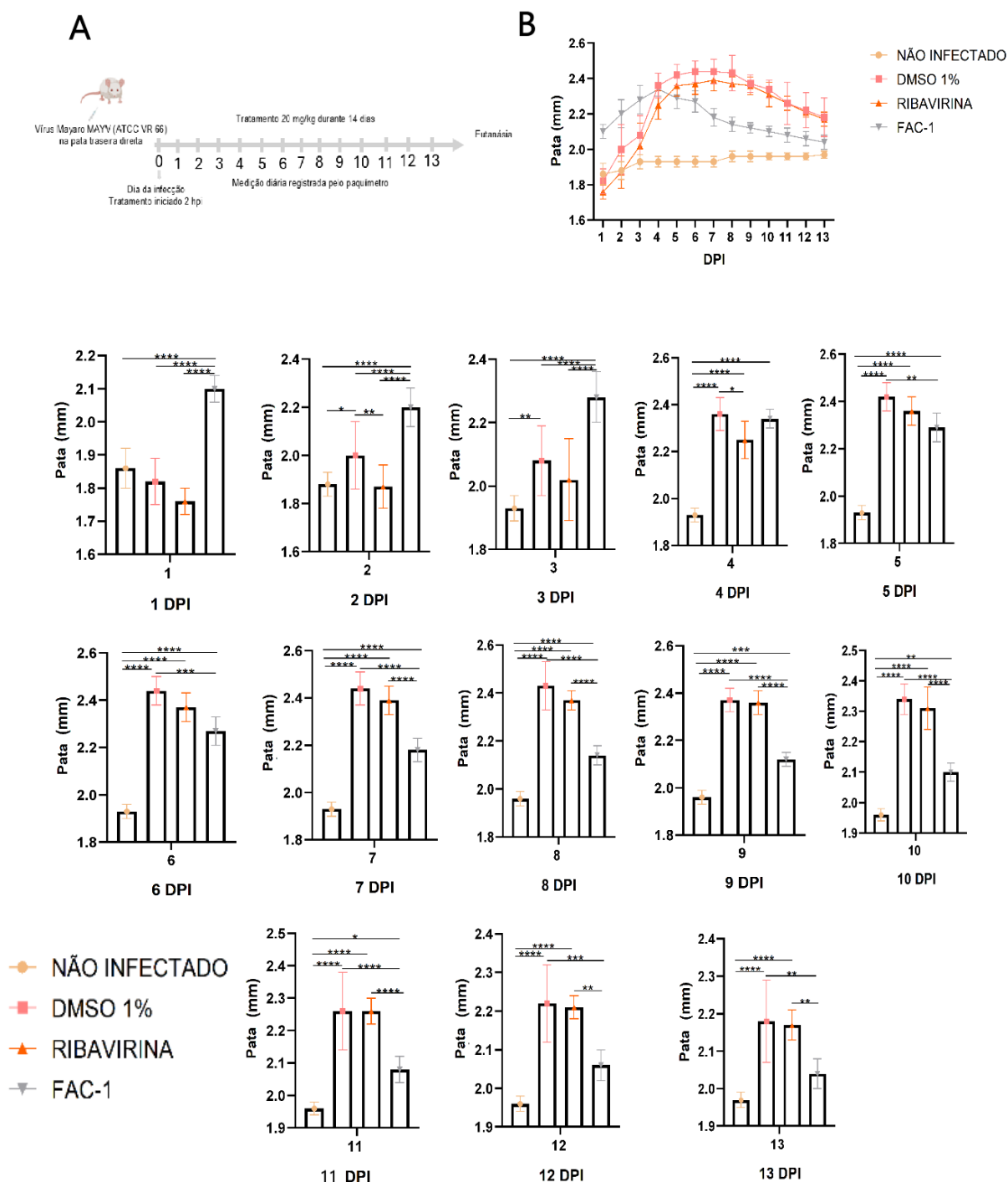


Figura 15. Linha do tempo e evolução do inchaço na pata dos animais. (A) Esquema representando o cronograma do experimento, incluindo infecção, início do tratamento e acompanhamento diário. (B) Evolução do inchaço nas patas ao longo dos dias pós-infecção (DPI), avaliada por paquímetro. Os dados foram analisados por meio de ANOVA, com comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Os níveis de significância estatística estão indicados por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

De acordo com os dados apresentados na Figura 15B, todos os grupos infectados apresentaram aumento do edema plantar a partir do 4º DPI. No entanto, o tratamento com a fração FAC-1 promoveu uma redução mais evidente do inchaço da pata (Figura 16B), quando comparado aos grupos que receberam ribavirina e DMSO 1%, sugerindo uma possível atividade de redução do inchaço da pata associada a esta fração. Na Figura 16A, os grupos infectados e tratados com DMSO 1% e ribavirina confirmam os resultados estatísticos observados nos gráficos dos dias 7 e 8 pós-infecção, período no qual foi identificado o pico do inchaço da pata dos animais. Por outro lado, no grupo tratados com a FAC-1, é possível observar a redução do inchaço, demonstrando maior semelhança com o grupo não infectado (Figuras 16A e 16B).



Figura 16. Evolução do edema nas patas dos animais. A imagem ilustra a progressão do inchaço nas patas dos camundongos infectados, sendo que a imagem (A) corresponde ao 8º dia pós-infecção e a imagem (B) ilustra o estado observado no 13º dia após a infecção.

4.2.2 PESO CORPORAL

Durante os 14 dias de tratamento, os camundongos foram submetidos à avaliação do peso corporal, cujas médias foram expressas em percentual,

considerando-se o valor inicial de cada animal como 100%. As variações ponderais estão representadas na Figura 17. A análise estatística, não indicou diferenças significativas entre os grupos analisados.

Apesar das análises estatísticas não apresentarem diferenças estatísticas, algumas variações no peso dos diferentes grupos foram observadas no decorrer dos dias. No 1º dia pós-infecção (1º DPI), não foram observadas alterações relevantes entre o grupo não infectado e os animais tratados com a fração FAC-1. Por outro lado, os grupos tratados com DMSO a 1% e ribavirina apresentaram redução do peso corporal nos primeiros dias, com valores mínimos em torno do 6º DPI. A partir do 8º dia, observou-se aumento do peso nesses grupos. Já os animais tratados com a fração FAC-1 apresentaram elevação do peso por volta do 5º DPI.

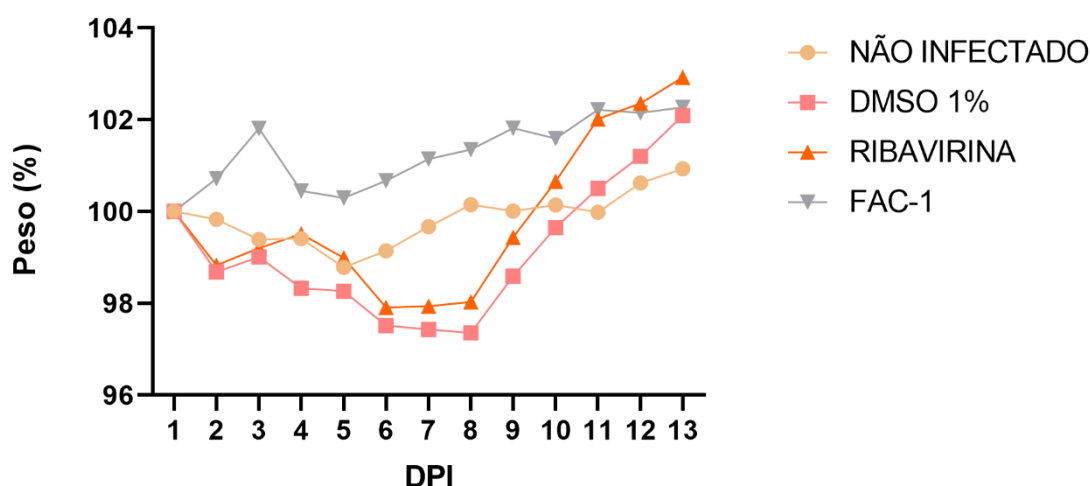


Figura 17. Evolução do peso corporal (%) dos camundongos ao longo de 13 dias pós-infecção (DPI). Os valores foram expressos em porcentagem, considerando-se o peso médio inicial de cada grupo como 100%. Observa-se que os grupos infectados tratados com DMSO 1% e ribavirina apresentaram perda de peso nos primeiros dias, com recuperação a partir do 8º DPI. O grupo tratado com a fração FAC-1 manteve-se mais próximo da linha de base e apresentou recuperação ponderal mais precoce, com padrão semelhante ao grupo não infectado.

4.2.3 ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o período experimental, os animais de todos os grupos foram eutanasiados, sendo realizado o procedimento de coleta do baço e do linfonodo inguinal. As amostras obtidas foram processadas para análise por citometria de fluxo, cujos resultados estão representados nos gráficos deste tópico. A análise imunofenotípica permitiu avaliar a distribuição e ativação de subpopulações de linfócitos T e B no baço e no linfonodo inguinal após 14 dias de infecção e tratamento.

No baço, os percentuais dessas subpopulações (gráficos Figura 18A–D) mantiveram-se estáveis entre os grupos, indicando que a redução foi quantitativa, mas não proporcional. Já o grupo tratado com a fração FAC-1 apresentou uma redução significativa no número absoluto de linfócitos totais (Figura 18E), $CD4^+$ (Figura 18F), $CD4^+FoxP3^+$ (Treg) (Figura 18G) e $CD8^+$ (Figura 18H), em comparação aos grupos infectados tratados com DMSO 1% e ribavirina (Figura 18).

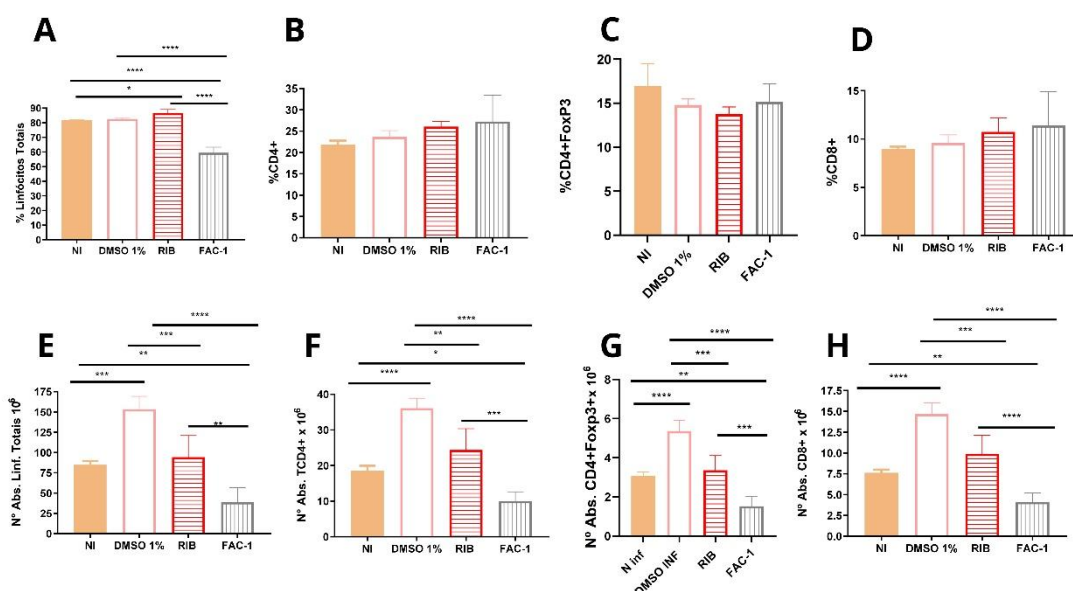


Figura 18. Perfil imunológico de linfócitos T no baço de camundongos após 14 dias de infecção e tratamento. As células foram obtidas a partir de baço total e analisadas por citometria de fluxo. Foram avaliados o percentual de linfócitos totais (A), $CD4^+$ (B),

CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) (C) e CD8⁺ (D), bem como os números absolutos dessas populações (E–H). NI = Não infectado; DMSO 1% = grupo controle infectado tratado com DMSO 1%; RIB = grupo infectado tratado com ribavirina; FAC-1 = grupo tratado com a fração. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Tukey. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Em relação aos linfócitos B do baço (Figura 19), a infecção por MAYV promoveu alterações de células B (B220⁺IgM⁺). Observou-se uma redução no percentual de células B nos grupos infectados tratados com DMSO 1%, ribavirina (RIB) e FAC-1 em comparação ao grupo não infectado, sendo essa redução significativa apenas no grupo tratado com FAC-1 quando comparado ao grupo não infectado (Figura 19A). Apesar da redução percentual analisado, o número absoluto de células B aumentou nos grupos infectados tratados com o veículo DMSO 1% e com a Ribavirina, sugerindo que tenha ocorrido uma possível ativação ou proliferação compensatória durante a infecção (Figura 19B). Por outro lado, o tratamento com FAC-1 resultou em uma diminuição acentuada tanto no percentual quanto no número absoluto de células B, o que poderia indicar um possível efeito imunomodulador dessa molécula no contexto da infecção pelo MAYV.

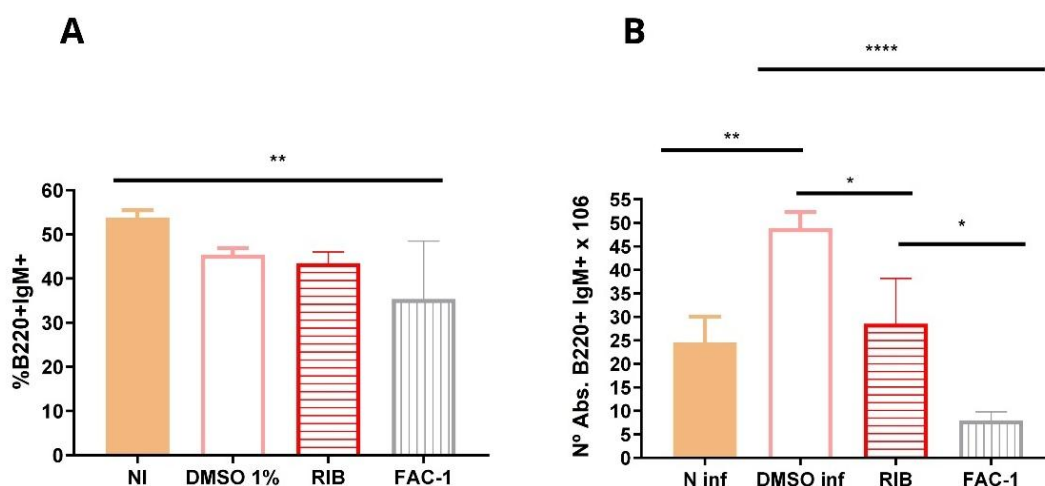


Figura 19. Perfil imunológico de linfócitos B no baço de camundongos após 14 dias de infecção e tratamento. Percentual e número absoluto de células B (B220⁺IgM⁺) no baço de camundongos Balb/c infectados com 10μL de MAYV (10⁴ PFU/mL). (A) Percentual de células B (B220⁺IgM⁺) no baço. (B) Número absoluto de células B (B220⁺IgM⁺) x 10⁶. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: não infectado (NI), infectado tratado com DMSO 1%, infectado tratado com ribavirina (RIB) e infectado tratado com a molécula FAC-1. Os dados representam a média ± erro padrão da média (EP). As diferenças estatísticas foram analisadas por teste ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Nos linfonodos inguinais, a análise dos linfócitos T (Figura 20) revelou um aumento do percentual de linfócitos totais (Figura 20A) e aumento no percentual da população de células T CD4⁺ (Figura 20B) no grupo FAC-1 em comparação ao grupo DMSO 1%. Adicionalmente, observou-se uma redução na frequência (Figura 20C) e número absoluto (Figura 20G) de células T reguladoras (CD4⁺FoxP3⁺), indicando um perfil imunológico regional menos supressor. O número absoluto de linfócitos totais (Figura 20E) e das subpopulações CD4⁺ (Figura 20F) e CD8⁺ (Figura 20H) não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

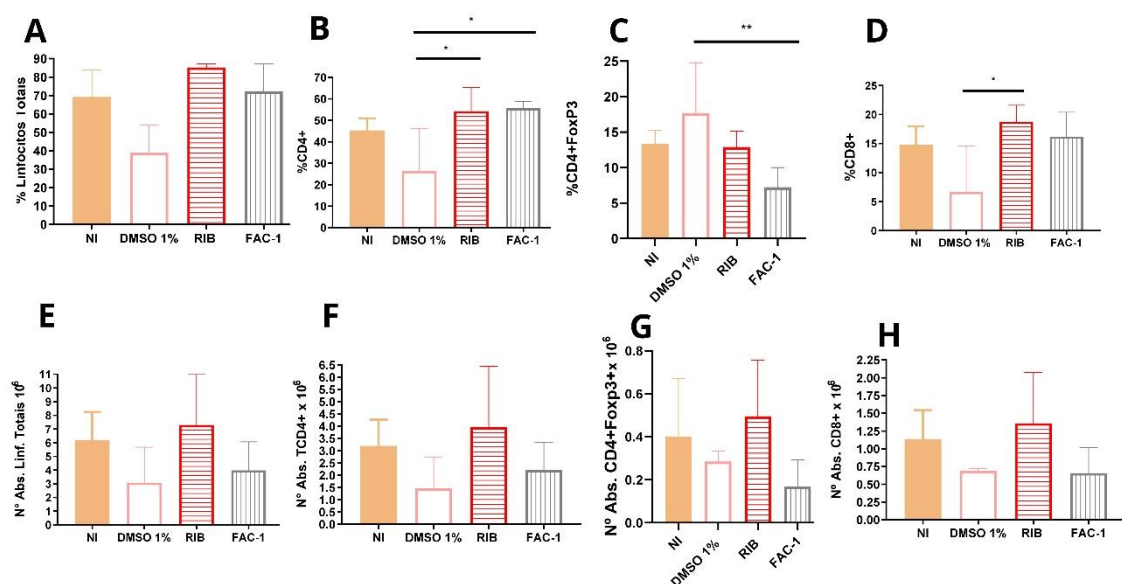


Figura 20. População de linfócitos T no linfonodo inguinal de camundongos após 14 dias de infecção e tratamento. Foram quantificados os percentuais e números absolutos de linfócitos totais (A, E), CD4⁺ (B, F), CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) (C, G) e CD8⁺ (D, H). NI = Não infectado; DMSO 1%; RIB = ribavirina; FAC-1 = fração testada. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Tukey. *p<0,05; **p<0,01.

Na avaliação dos linfócitos B do linfonodo (Figura 21), observou-se que o grupo FAC-1 apresentou os menores valores tanto no percentual (Figura 21A) quanto no número absoluto (Figura 21B) de células B maduras ($B220^{+}IgM^{+}$), reforçando o padrão de inibição da ativação humoral também nesta região linfóide periférica.

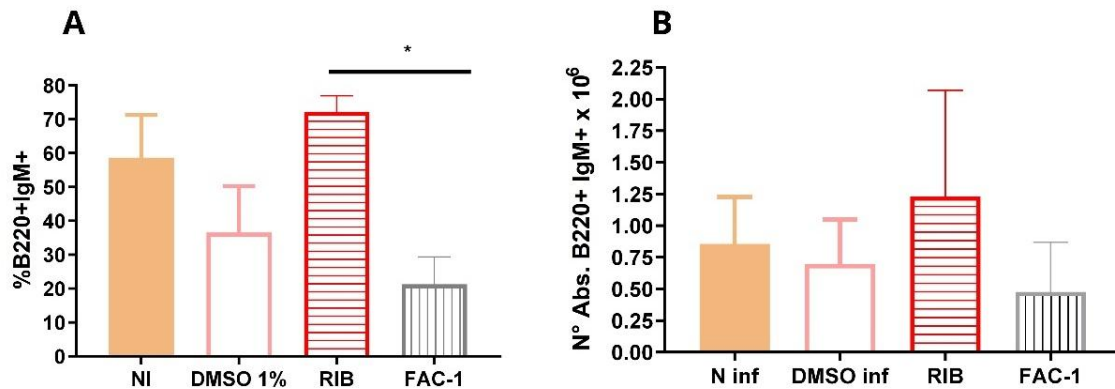


Figura 21. População de linfócitos B no linfonodo inguinal após 14 dias de infecção e tratamento. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: não infectado (NI), infectado tratado com DMSO 1%, infectado tratado com ribavirina (RIB) e infectado tratado com a molécula FAC-1. (A) Percentual de células B ($B220^{+}IgM^{+}$). (B) Número absoluto dessas células. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Nos gráficos de razão $CD8^{+}/FOXP3^{+}$ do baço (Figura 22), observa-se que todos os grupos infectados (DMSO 1%, Ribavirina e FAC-1) apresentam uma razão ligeiramente mais elevada em relação ao grupo não infectado, tanto em percentual (Figura 22A) quanto em número absoluto (Figura 22B). No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que o tratamento com FAC-1 não induziu uma modulação relevante nesse parâmetro no baço.

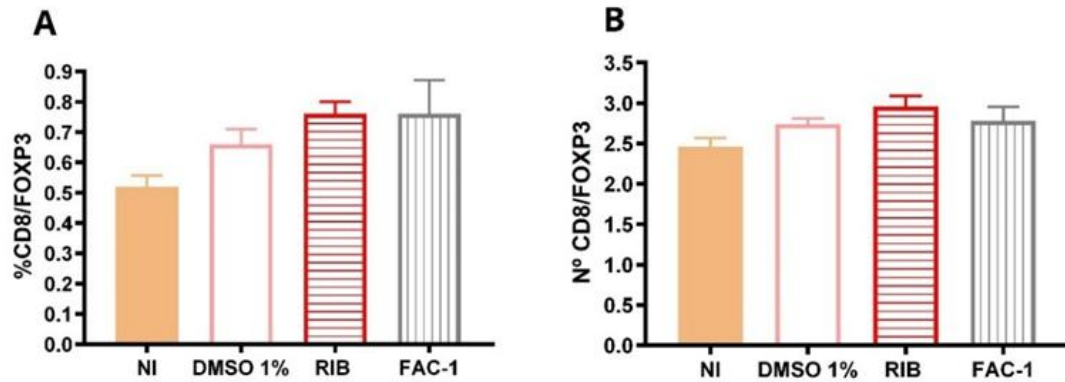


Figura 22. Razão entre linfócitos T CD8⁺ e células T reguladoras (CD4⁺FOXP3⁺) no baço de camundongos infectados. (A) Razão percentual CD8⁺/FOXP3⁺; (B) Razão baseada no número absoluto de células. Os dados mostram que, embora haja uma tendência de aumento da razão nos grupos tratados, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Tukey. *p<0,05; **p<0,01.

Já no linfonodo inguinal (Figura 23), o gráfico (Figura 23A) revela diferença estatisticamente significativa no percentual da razão CD8⁺/FOXP3⁺, sendo o grupo tratado com FAC-1 aquele que apresentou a maior razão entre células citotóxicas e Tregs em comparação ao grupo não infectado. Esse achado indica que o tratamento pode ter contribuído para uma resposta imune mais ativa e com menor atividade reguladora localmente, o que pode estar relacionado à contenção da infecção no sítio periférico. O gráfico (Figura 23) mostra tendência semelhante no número absoluto, mas sem significância estatística.

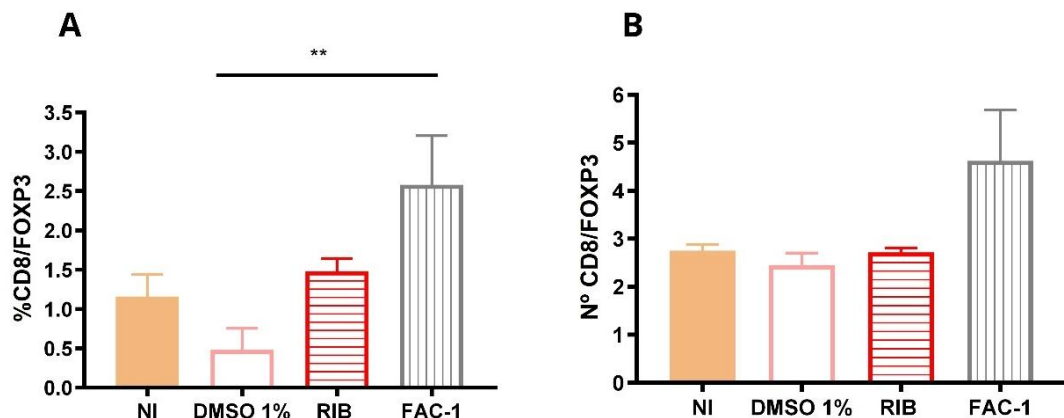


Figura 23. Razão entre linfócitos T CD8⁺ e células T reguladoras (CD4⁺FOXP3⁺) no linfonodo inguinal. (A) Razão percentual CD8⁺/FOXP3⁺; (B) Razão baseada no número absoluto de células. Verifica-se aumento significativo da razão percentual no grupo

tratado com FAC-1 em comparação ao grupo não infectado, sugerindo ativação imune periférica. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.4 ANÁLISE DO MÚSCULO DA PATA

A análise histopatológica do músculo da pata no experimento de eficácia terapêutica demonstrou que o grupo dos animais não infectados apresentou tecido muscular preservado, sem alterações histopatológicas evidentes (Figuras 24A e 24B).

O grupo infectado e tratado com DMSO 1% apresentou necrose coagulativa, edema, desorganização do tecido muscular e congestão vascular. Além disso, foram observados hemorragia, infiltrado inflamatório perivascular e intersticial, bem como infiltrado adiposo local. Em determinadas regiões do tecido, observou-se alterações mais graves, com ausência de núcleos celulares, associadas à necrose e à desorganização dos sarcômeros (Figuras 24C e 24D).

Adicionalmente, no grupo dos animais infectados e tratados com ribavirina, a análise histopatológica evidenciou possíveis infiltrados inflamatórios, além da presença de tecido adiposo associado a infiltrado inflamatório. Também, foram observadas áreas de desorganização do tecido muscular e núcleos alongados. Em algumas regiões, foi possível observar a ausência de núcleos e necrose coagulativa, bem como alguns danos característicos de miosite inflamatória infecciosa (Figuras 24E e 24F).

Os animais infectados e tratados com a fração FAC-1 da alga apresentaram leve infiltrado inflamatório (Figuras 24G e 24H). Os achados histopatológicos demonstraram menor comprometimento tecidual nos animais tratados com a fração FAC-1 quando comparados aos grupos tratados com DMSO 1% e ribavirina, sugerindo um possível efeito protetor da fração FAC-1 contra danos musculares induzidos pela infecção por MAYV.

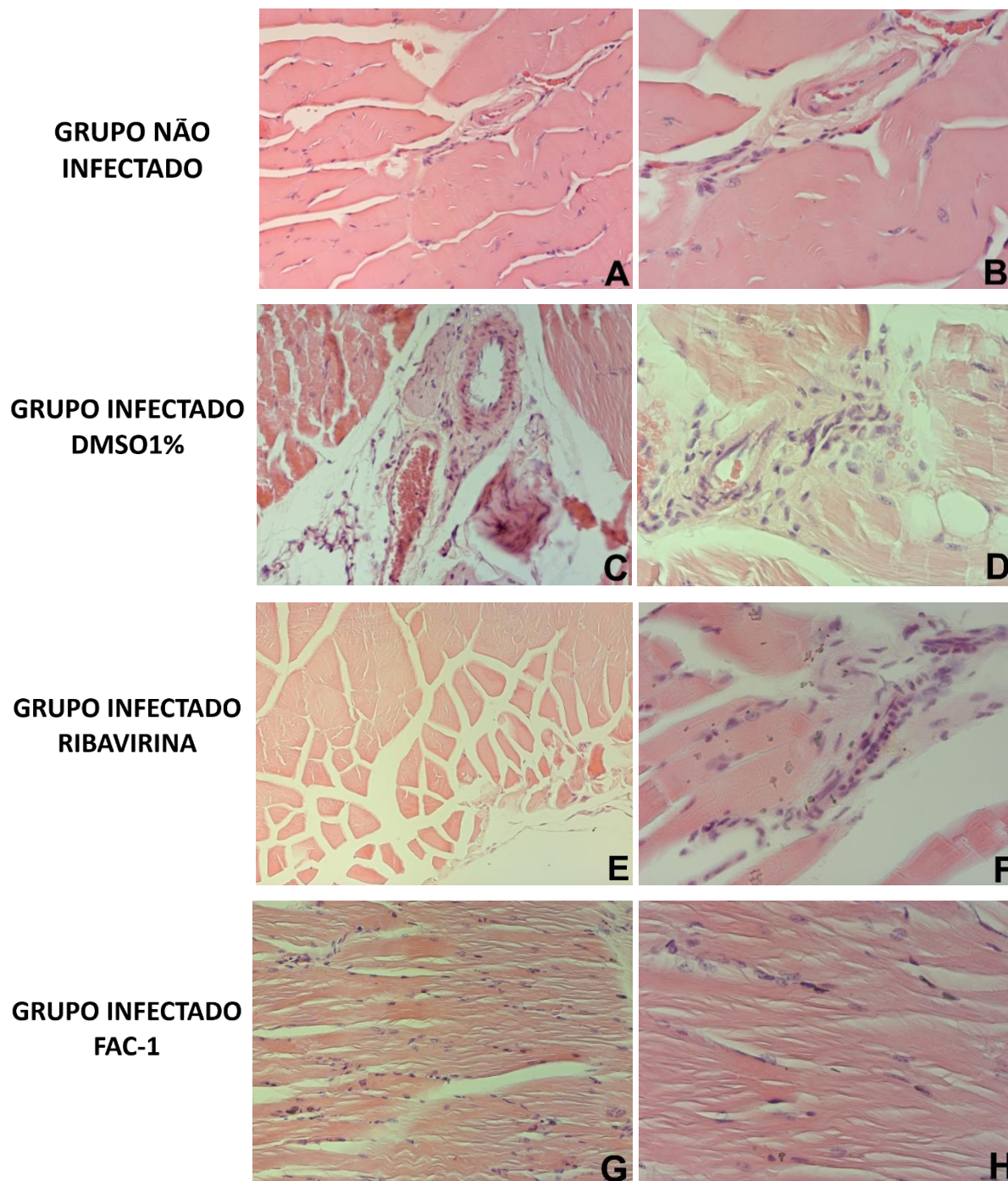


Figura 24. Imagens histopatológicas do músculo da pata de camundongos submetidos aos ensaios de eficácia terapêutica. Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais: (A-B) grupo não infectado e tratado; (C-D) grupo infectado e tratado com DMSO a 1%; (E-F) grupo infectado e tratado com ribavirina; e (G-H) grupo infectado e tratado com a fração FAC-1. As imagens A, C, E e G correspondem ao aumento de 200×, enquanto as imagens B, D, F e H correspondem ao aumento de 400×. As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina (HE).

5 DISCUSSÃO

A busca por antivirais contra o MAYV vem sendo apresentada em diferentes estudos com extratos de algas (PASCHOALINO *et al.*, 2023; ANDREOLLA *et al.*, 2022; MELLO *et al.*, 2020), evidenciando sua relevância, uma vez que o vírus pode levar a condições crônicas e há um número crescente de infecções por MAYV. Além disso, a falta de medicamentos aprovados faz com que o tratamento seja apenas paliativo, baseado no controle dos sintomas com analgésicos e/ou anti-inflamatórios não esteroides (PASCHOALINO *et al.*, 2023). Logo, as frações do extrato da alga *Dictyota menstrualis* apresentam-se como importantes candidatas no desenvolvimento de antivirais.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral e imunomoduladora das frações da alga *D. menstrualis* em experimentos *in vitro* e *in vivo* contra o vírus Mayaro.

Na triagem das frações da alga *D. menstrualis*, com o objetivo de identificar aquela com maior potencial antiviral, foram selecionadas três frações (FAC-1, FAC-2 e FAC-3) e o extrato bruto (EBDM) para avaliação do percentual de inibição viral. Entre elas, a fração FAC-1 destacou-se por apresentar 97% de inibição do vírus Mayaro em células Vero, seguida pela FAC-2, com 64%, pelo EBDM, com 32%, e pela FAC-3, com 15%. Esses resultados demonstram uma diferença significativa na atividade antiviral entre as frações, sugerindo que compostos com atividade contra o MAYV estejam mais concentrados na FAC-1. Além disso, estudos anteriores do nosso grupo (CIRNE-SANTOS *et al.*, 2020a) já haviam demonstrado a eficácia de frações dessa mesma alga contra o vírus Chikungunya, pertencente à mesma família (Togaviridae) e ao mesmo gênero (*Alphavirus*). Nesse estudo, a FAC-1 também apresentou elevada atividade antiviral, com 98% de inibição, seguida pela FAC-2, com 68%, e pelo extrato bruto, com 28%, enquanto a FAC-3 não foi avaliada. A semelhança entre os perfis de inibição observados para MAYV e CHIKV sugere que os compostos presentes nessas frações podem atuar sobre alvos conservados entre alfavírus, indicando um possível mecanismo de ação comum. A maior eficácia da FAC-1 contra ambos os vírus também indica que os metabólitos com atividade antiviral

podem estar mais concentrados nessa fração. Dessa forma, os achados do presente estudo não apenas corroboram os dados previamente descritos na literatura, mas também ampliam as evidências de que compostos derivados de *D. menstrualis* apresentam potencial como candidatos promissores para o desenvolvimento de antivirais de amplo espectro contra arbovírus.

A fração FAC-1, por apresentar uma maior inibição contra o MAYV (97%) com 20 µg/mL, foi escolhida para os experimentos que determinam a capacidade do composto de inibir em 50% da replicação viral (EC_{50}). Como resultado, identificamos o potente valor de EC_{50} de 4,1 µg/mL. Nosso resultado de EC_{50} é muito significativo quando comparado com outros extratos e frações de produtos naturais descritos na literatura para o MAYV, como os demonstrados para a *Fridericia chica* (DA CRUZ et al., 2022), que tiveram um EC_{50} de $30,1 \pm 2,0$ µg/mL, e subfrações do extrato de *Bidens pilosa*, com valor de EC_{50} de $27,58 \pm 2,82$ µg/mL (GV-07) (VALENTE, 2022). A FAC-1 também apresentou um EC_{50} menor que o extrato de *Luxemburgia polyandra* (SILVA, 2025), sendo identificado o valor de EC_{50} de $48,90 \pm 2,52$, tal como a ribavirina (DA CRUZ et al., 2022), substância utilizada como controle positivo, que apresentou um EC_{50} de $29,21 \pm 1,4$ nos mesmos ensaios. Além disso, a eficácia da FAC-1 é semelhante à silimarina, um complexo de antioxidantes extraído da planta *Silybum marianum*, que demonstrou valor de EC_{50} de 3,58 µg/mL em seus estudos (DOMINGOS, 2024). De acordo com os critérios utilizados para a triagem de novos compostos antivirais, o valor de EC_{50} de 4,1 µg/mL indica que a FAC-1 apresenta elevada atividade antiviral, sendo considerada uma candidata promissora, uma vez que esse valor está bem abaixo do limite de 50 µg/mL estabelecido para essa classificação (SILVA, 2025).

Na avaliação da atividade antiviral da fração FAC-1 em neurônios infectados pelo MAYV, observou-se que as concentrações de 20 µg/mL e 10 µg/mL foram capazes de preservar a morfologia e a integridade celular, indicando um efeito protetor contra ao dano induzido pela infecção viral. Na concentração de 20 µg/mL, esse efeito foi mais evidente, com maior número de células viáveis e aspecto morfológico semelhante ao controle de células. Em contrapartida, na concentração de 5 µg/mL, a inibição foi menos expressiva, sendo possível

observar redução da viabilidade celular e alterações morfológicas compatíveis com o efeito citopático viral, aproximando-se do padrão observado no controle de vírus. Esses resultados demonstram que a FAC-1 promove inibição da replicação viral de forma dose-dependente, com maior eficácia na concentração de 20 µg/mL, contribuindo para a manutenção da estrutura neuronal após 72 horas de infecção. Estudos realizados com o vírus Chikungunya, que, assim como o Mayaro, é um alphavírus, demonstraram que a infecção *in vitro* de células microgliais humanas C20 resulta em intensos efeitos citopáticos, incluindo arredondamento, granulação, desprendimento celular e acentuada perda de viabilidade (KUMAR *et al.*, 2024). A semelhança entre os vírus demonstra a potencialidade de ambas as células sofrerem alterações celulares significativas. Também, considerando o potencial neurotropismo do vírus, isto é, sua capacidade de infectar astrócitos e células progenitoras neuronais, o que pode resultar em danos neurológicos (Bengue *et al.*, 2021), observamos que a FAC-1, pode contribuir para prevenir esse tipo de infecção. Dessa forma, os achados encontrados para o MAYV evidenciam a potencialidade da FAC-1 na diminuição do efeito citopático viral e na proteção que a substância exerce, demonstrando um efeito promissor como antiviral.

Com a atividade antiviral evidenciada, buscou-se avaliar se a FAC-1 apresentava ação sobre as diferentes etapas do processo de infecção viral, caracterizando possíveis mecanismos de ação. Para isso, foi realizado o ensaio virucida no qual a fração apresentou 28% de inibição da infectividade viral com a concentração de 20 µg/mL da fração. Na literatura, diferentes extratos de produtos naturais apresentaram atividade virucida significativamente mais potente para o MAYV, tais como o extrato hidroetanólico de *Fridericia chica* (LOPES; LIMA; SANTOS; NUNES *et al.*, 2022) que eliminou totalmente as placas de PFU nas concentrações de 6,25 µg/mL a 25 µg/mL, simultaneamente, o extrato de folhas de *Maytenus quadrangulata* apresentou redução eficiente a formação de placas nas concentrações de 50 e 25 µg/mL, enquanto a 100 µg/mL, houve inibição total da formação de placa (DE FÁTIMA NUNES *et al.*, 2023). Além disso, o extrato etanólico de romã (*Punica granatum*) apresentou atividade virucida de 98% contra o MAYV (SALLES *et al.*, 2021). Em relação aos outros extratos vegetais, a inativação direta das partículas virais com a FAC-1 é

inferior, entretanto, estudos realizados pelo nosso grupo corroboram com os achados da FAC-1, uma vez que a mesma fração apresentou redução de 39% da infectividade viral para o vírus CHIKV (CIRNE-SANTOS *et al.*, 2020a). Esses resultados sugerem que, embora a nossa fração exerça pequena ação sobre as partículas virais, ainda assim produziu uma inibição. Logo, esses resultados sugerem que, mesmo a FAC-1 apresentando atividade inibição de 28% sobre as partículas virais, esse efeito é comedido, o que sugere que a fração possa atuar na interferência de outras etapas do ciclo de multiplicação das partículas virais, e não diretamente sobre o vírus.

Em relação ao ensaio de adsorção, a FAC-1 demonstrou forte capacidade de impedir a ligação do MAYV aos receptores das células Vero, atingindo 81% de inibição na concentração de 20 µg/mL da fração do extrato. Esses achados são significativamente relevantes quando comparado com outros extratos de produtos naturais encontrados na literatura, tais como o os de *Fridericia chica*, que na concentração de 25 µg/mL, não afetou a infecção das células pelo MAYV em comparação com os controles não tratado (LOPES *et al.*, 2022), além desses achados, o extrato de *Maytenus quadrangulata* não diminuiu a adsorção do MAYV nas concentrações 6,25 a 200 µg/mL do extrato, indicando que a atividade anti-MAYV do *M. quadrangulata* não depende da sua ligação aos receptores celulares (DE FÁTIMA NUNES *et al.*, 2023). Logo, a FAC-1 apresentou resultados superiores de diferentes extratos mencionados em artigos científicos, com inibição da adsorção e efeito dose-dependente estatisticamente relevante, corroborando com achados anteriores do nosso grupo, uma vez que a mesma fração apresentou 66% de inibição da adsorção para o vírus Chikungunya (CIRNE-SANTOS *et al.* 2020), interferindo assim diretamente na interação inicial vírus–célula.

Considerando que a fração FAC-1 apresentou promissores resultados de atividade antiviral nos experimentos *in vitro*, ela foi selecionada para os experimentos nos quais utilizamos camundongos BALB/c para avaliar sua atividade antiviral *in vivo*. Logo, os camundongos foram submetidos ao experimento de eficácia terapêutica contra o MAYV, sendo infectados no coxim plantar da pata traseira direita. Durante o experimento não foi observado

letalidade ou alteração dos sinais clínicos nos grupos de animais submetidos à infecção e ao tratamento com as substâncias. Diferentes estudos demonstram que a infecção pelo MAYV em camundongos não resulta em mortalidade, alteração de sinais clínicos evidentes ou perda significativa de peso corporal (LIMA *et al.*, 2026), o que afirma os nossos achados (Figura 17).

Na análise do inchaço da pata dos animais do experimento da eficácia terapêutica, todos os grupos infectados apresentaram aumento progressivo do edema plantar, no qual atingiram o pico de inchaço entre o 4º e o 7º dia pós-infecção (DPI). A partir do 5º dia pós-infecção os animais tratados com a FAC-1 tiveram uma redução significativa do edema, comparado ao grupo controle (DMSO 1%) e ao grupo tratado com ribavirina. Ao final do experimento, o edema dos animais tratados com a FAC-1 não apresentou diferença estatisticamente do grupo controle não infectado (Figuras 16A e 16B). Por outro lado, o grupo tratado com ribavirina se assemelhou com o grupo DMSO 1%, logo, não houve diferença estatística entre eles. Em modelos murinos o edema no coxim plantar representa uma clássica manifestação clínica em animais infectados por alphavirus artritogênicos, tais como o MAYV (LIMA *et al.*, 2026; ROSA *et al.*, 2025).

A redução do inchaço observada a partir do 5º dia pós-infecção nos animais infectados e tratados com a FAC-1 demonstra um resultado promissor e se assemelha aos achados descritos na literatura para animais tratados com produtos naturais, como a silimarina, que foi capaz de reduzir o edema plantar em camundongos BALB/c, modificando a progressão temporal da inflamação em animais infectados pelo MAYV (LIMA *et al.*, 2026).

Os efeitos observados para a FAC-1 podem estar relacionados à presença de diterpenos encontrados em *D. menstrualis*, especialmente os do tipo xeniano, que já apresentaram atividade anti-inflamatória em estudos *in vivo* na literatura (OBANDO *et al.*, 2025). Como essa fração é obtida da alga *D. menstrualis*, é possível que sua ação esteja associada à modulação da resposta inflamatória local. Além disso, a redução do edema observada nos animais sugere uma diminuição do processo inflamatório e do infiltrado celular no local da infecção.

O peso corporal dos animais foi analisado durante os 14 dias do experimento e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados. Apesar das análises não apresentarem diferenças estatísticas, algumas variações no peso dos diferentes grupos foram observadas ao longo dos dias. Os grupos tratados com DMSO a 1% e ribavirina apresentaram redução do peso corporal nos primeiros dias, com valores mínimos em torno do 6º DPI e aumento a partir do 8º dia. Já os animais tratados com a fração FAC-1 apresentaram elevação do peso por volta do 5º DPI, embora sem significância estatística entre os grupos.

Na literatura, iremos encontrar diferentes efeitos sobre o peso ponderal em modelos murinos durante a infecção pelo MAYV (MOTA *et al.*, 2020; ARÉVALO *et al.*, 2026; LIMA *et al.*, 2026;). As variações podem se diferenciar e se relacionar a fatores distintos, como a idade dos animais, a linhagem dos camundongos, a virulência da cepa viral e as diferentes características do modelo experimental utilizado durante as etapas experimentais (ARÉVALO *et al.*, 2026; MOTA *et al.*, 2020).

Apesar de nossos resultados apresentarem variações no peso ponderal dos grupos FAC-1, ribavirina e DMSO 1% ao longo do período experimental, essas variações não foram estatisticamente significantes nas análises ANOVA; logo, possivelmente, a infecção não tenha promovido um impacto elevado sobre o parâmetro do peso (LIMA *et al.*, 2026). Sendo assim, os resultados encontrados durante a infecção e o tratamento dos animais não foram considerados um marcador sensível para detectar diferença entre os grupos experimentais, assim como os achados de LIMA *et al.*, 2026. Os resultados podem ter correlação com a utilização de camundongos BALB/c imunocompetentes, visto que apresentam uma maior capacidade de controlar a infecção viral através da resposta imune inata, pela ação do interferon tipo I, que leva a uma infecção mais branda e autolimitada pelo MAYV (ARÉVALO *et al.*, 2026; MOTA *et al.*, 2020).

Por outro lado, a literatura também relata estudos com a infecção pelo MAYV em modelos murinos, nos quais as manifestações clínicas variam de acordo com as características do hospedeiro e do vírus, o que pode levar a diferentes graus de comprometimento sistêmico. Como exemplo, camundongos com deficiência

nos receptores de interferon (A129) apresentaram perda de peso progressiva e letalidade (MOTA *et al.*, 2020) . Sendo assim, a ausência de alterações estatísticas significativas na avaliação do peso corporal em nossos achados não contradiz os estudos que demonstram alterações, porém, reforça que tais manifestações durante a infecção pelo MAYV irão depender diretamente do contexto biológico e metodológico utilizado durante o experimento (ARÉVALO *et al.*, 2026; LIMA *et al.*, 2026; MOTA *et al.*, 2020).

Os resultados encontrados na citometria sugerem que a fração FAC-1 atua como imunomodulador em camundongos infectados por MAYV. O aumento de linfócitos T CD4⁺ e a redução de Treg (CD4⁺FoxP3⁺) no linfonodo inguinal podem favorecer uma resposta efetora local mais eficiente, promovendo controle viral na periferia e possivelmente contribuindo para a redução da viremia do vírus. Esse achado está de acordo com estudos da literatura que demonstram a importância da imunidade adaptativa para restringir a replicação do MAYV e contribuir para sua eliminação durante a infecção (DA SILVA *et al.*, 2024).

Por outro lado, no baço, o tratamento com a fração FAC-1 levou à redução no número absoluto de linfócitos totais (Figura 18E), bem como das subpopulações CD4⁺ (Figura 18F), CD8⁺ (Figura 18H) e CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) (Figura 18G) em comparação aos grupos infectados e tratados com DMSO 1% e ribavirina (Figura 18).

Esse achado pode estar relacionado a mecanismos já descritos na literatura para a dinâmica da resposta imune durante infecções virais. Logo, com o controle inicial da infecção, ocorre a contração da resposta imune, (SCHEPERS *et al.*, 2005) sendo caracterizada pela redução do número de células do sistema imune após o pico da resposta, o que pode contribuir para limitar uma resposta inflamatória e evitar uma resposta imune excessiva. Além disso, a literatura relata que, durante a infecção por alphavirus acometida pela pata dos animais, ocorre a migração de células imunes para o linfonodo poplíteo, que é o principal responsável pela drenagem daquela região (DE ARAÚJO *et al.*, 2022). Logo, é possível que a redução observada seja consequência desse recrutamento celular.

Paralelamente, é importante considerar que a resposta imune adaptativa exerce papel central no controle do MAYV, mas também pode estar associada ao desenvolvimento de processos inflamatórios e danos teciduais quando ocorre de maneira excessiva (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). No entanto, esse efeito ainda precisa ser melhor investigado, a fim de se compreender se tal perfil representa um impacto benéfico ou prejudicial contra à infecção pelo MAYV. De toda forma, esse padrão observado está de acordo com a ideia descrita na literatura de que, na infecção por MAYV, é necessário um equilíbrio na resposta imune adaptativa, uma vez que a ativação exacerbada pode contribuir para o surgimento de sintomas clínicos mais intensos e persistentes (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

A avaliação histopatológica do músculo da pata no experimento de eficácia terapêutica evidenciou, no grupo tratado com DMSO 1% (Figuras 24C e 24D), diferentes alterações teciduais, tais como edema, necrose coagulativa, desorganização do tecido muscular e congestão vascular. Também, identificou-se infiltrado inflamatório perivascular e intersticial, bem como infiltrado adiposo local. Em diferentes regiões do tecido, identificaram-se alterações mais graves, como a ausência de núcleos celulares, que está geralmente associada à necrose e à desorganização dos sarcômeros. Esses achados corroboram a patogênese aguda descrita na literatura, que relata uma reação inflamatória em que neutrófilos substituem parcialmente a camada muscular, resultando na perda da arquitetura tecidual e em miosite severa em camundongos infectados pelo MAYV (MOTA *et al.*, 2020).

Em paralelo, no grupo dos animais tratados com ribavirina e infectados pelo MAYV, a análise tecidual apresentou possíveis infiltrados inflamatórios, presença de tecido adiposo associado a infiltrado inflamatório, e, também, áreas de desorganização tecidual no músculo e presença de núcleos alongados. Em dadas regiões, notou-se a ausência de núcleos e necrose coagulativa e danos característicos de miosite inflamatória infecciosa (Figuras 24E e 24F). Esses resultados estão condizentes com a literatura existente, que destacam que a eficácia de diferentes tratamentos antivirais em modelos murinos, são frequentemente limitadas e insuficientes no qual não impedem o comprometimento histopatológico após a indução da infecção (ROSA *et al.*,

2023), o que demonstra e reforça que a ribavirina não atuaria como agente protetor eficaz contra a patologia induzida pelo vírus.

Os achados histopatológicos demonstraram menor comprometimento tecidual nos animais tratados com a fração FAC-1 quando comparados aos grupos tratados com DMSO 1% e ribavirina, sugerindo um possível efeito protetor da fração FAC-1 contra os danos musculares induzidos pela infecção por MAYV. Nesse grupo, os animais infectados e tratados com a fração FAC-1 da alga apresentaram apenas leve infiltrado inflamatório (Figuras 24G e 24H). A capacidade de proteger o tecido assemelha-se ao observado na literatura para o silimarina, um composto natural que demonstrou diminuir significativamente os infiltrados inflamatórios nos músculos esqueléticos e reduzir diferentes danos teciduais através da modulação da resposta inflamatória em camundongos BALB/c infectados pelo MAYV (LIMA *et al.*, 2026).

O grupo dos animais não infectados apresentou tecido muscular preservado, sem alterações histopatológicas evidentes (Figuras 24A e 24B). Em conjunto, esses resultados demonstram que a fração FAC-1 apresentou melhor preservação do tecido muscular quando comparada às análises histopatológicas dos animais do grupo tratado com ribavirina e DMSO 1%, destacando seu potencial na redução dos danos musculares e da miosite inflamatória induzida pela infecção por MAYV em camundongos BALB/c.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÃO

A fração FAC 1, derivada da alga marinha *Dictyota menstrualis*, apresentou expressiva atividade antiviral contra ao vírus Mayaro (MAYV), com 97% de inibição na concentração de 20 µg/mL e EC₅₀ de 4,1 µg/mL.

Em ensaios com neurônios de retina de embriões de pinto, a fração FAC-1 apresentou efeito protetor contra a infecção pelo MAYV, principalmente nas concentrações de 20 µg/mL, mantendo a morfologia e a integridade celular.

No ensaio virucida, a FAC-1 apresentou efeito direto moderado sobre as partículas virais, promovendo 28% de inibição da infectividade do MAYV, sugerindo que sua principal atividade antiviral não está associada diretamente à inativação da partícula viral, mas possivelmente relacionada à interferência em outras etapas do ciclo de multiplicação.

Em contrapartida, no ensaio de adsorção, a FAC-1 demonstrou forte capacidade de interferir na ligação do vírus às células hospedeiras, atingindo 81% de inibição, evidenciando que sua principal ação antiviral ocorre na etapa inicial da infecção, bloqueando a entrada viral.

Os resultados obtidos demonstram que a fração FAC-1 apresenta efeitos relevantes durante a infecção experimental por MAYV. O tratamento com FAC-1 promoveu redução significativa do edema nas patas, com regressão mais rápida do inchaço em comparação aos demais grupos. Também foi observada uma recuperação mais precoce do peso corporal nos animais tratados, porém, sem diferença estatística. Logo, a junção dos resultados indica uma tendência de melhora no estado clínico geral ao longo da infecção dos animais tratados com a fração da alga.

A análise da citometria revelou que a FAC-1 exerceu ação imunomoduladora. No linfonodo inguinal, observou-se aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ e redução de células T reguladoras (Treg). No baço, o tratamento com a fração FAC-1 promoveu redução de linfócitos totais, CD4⁺, CD8⁺ e Treg em comparação aos grupos infectados tratados com DMSO 1% e ribavirina.

Na análise histopatológica do tecido muscular, os animais infectados e tratados com a fração FAC-1 da alga apresentaram leve infiltrado inflamatório, demonstrando menor comprometimento tecidual quando comparados aos grupos tratados com DMSO 1% e ribavirina, sugerindo um possível efeito protetor da fração FAC-1 contra os danos musculares induzidos pela infecção por MAYV.

De forma geral, os dados obtidos indicam que a fração FAC-1 possui um potencial promissor como agente antiviral e imunomodulador contra ao MAYV,

tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sendo assim, esses dados corroboram e justificam para um futuro investimento na avaliação da segurança da FAC-1 em modelos mais robustos.

6.2 PERSPECTIVAS

Como perspectiva, é importante avaliar o efeito imunomodulador da FAC-1 em animais não infectados, para determinar sua capacidade de modular a resposta imune na ausência da infecção viral. Também, é necessário repetir os experimentos com camundongos BALB/c machos, a fim de identificar possíveis diferenças na resposta ao tratamento entre os sexos.

Além disso, deve-se investigar o linfonodo poplíteo, visto que, quando a infecção ocorre na pata dos animais, este é o principal linfonodo de drenagem do sítio de infecção, a fim de avaliar a possível migração e o recrutamento de células do sistema imune.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBO, S. R.; NGUYEN, W.; ABMA-HENKENS, M. H.; VAN DE KAMER, D. *et al.* Comparative efficacy of Mayaro virus-like particle vaccines produced in insect or mammalian cells. **Journal of Virology**, v. 97, n. 3, p. e01601-22, 2023.

ADAMSON, C. S.; CHIBALE, K.; GOSS, R. J.; JASPARS, M. *et al.* Antiviral drug discovery: preparing for the next pandemic. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 6, p. 3647-3655, 2021.

ALBUQUERQUE, I. R. L.; CORDEIRO, S. L.; GOMES, D. L.; DREYFUSS, J. L. *et al.* Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of a heterofucan from *Dictyota menstrualis*. **Marine drugs**, v. 11, n. 8, p. 2722-2740, 2013.

ANDERSEN, P. I.; IANEVSKI, A.; LYSVAND, H.; VITKAUSKIENE, A. *et al.* Discovery and development of safe-in-man broad-spectrum antiviral agents. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 93, p. 268-276, 2020.

ANDREOLLA, A. P.; BORGES, A. A.; BORDIGNON, J.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. J. V. Mayaro virus: The state-of-the-art for antiviral drug development. **Viruses**, v. 14, n. 8, 2022.

ARÉVALO, A.; PERBOLIANACHIS, P.; PÓRFIDO, J.; PEREIRA-GÓMEZ, M. *et al.* Systemic dissemination, reproductive tissue tropism and gestational stage-dependent placental responses during Mayaro virus infection in a murine model. **bioRxiv**, p. 2026.01.04.693264, 2026.

BENGUE, M.; FERRARIS, P.; BARTHELEMY, J.; DIAGNE, C. T. *et al.* Mayaro virus infects human brain cells and induces a potent antiviral response in human astrocytes. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 465, 2021.

BENGUE, M.; PINTONG, A.-r.; LIEGEOIS, F.; NOUGAIREDE, A. *et al.* Favipiravir inhibits Mayaro virus infection in mice. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2213, 2021.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Nota Técnica nº 6/2024-CGAR/DEDT/SVSA/MS: Orientações para a vigilância da Febre do Oropouche. Brasília, 22 fev. 2024. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/765836761/Nota-Tecnica-n%C2%BA-6-2024-CGAR-DEDT-SVSA-MS>>. Acesso em: 2026.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Cenário epidemiológico das arboviroses: 8ª reunião ordinária da Comissão Intergestores Tripartite. Brasília, 26 ago. 2025. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/gestao-do-sus/articulacao-interfederativa/cit/pautas-de-reunioes-e-resumos/2025/agosto/informe-cenario-epidemiologico-das-arboviroses>>. Acesso em: 2026

BRUSTOLIN, M.; BARTHOLOMEUSEN, K.; REZENDE, T.; ARIËN, K. K. *et al.* Mayaro virus, a potential threat for Europe: vector competence of autochthonous vector species. **Parasites & Vectors**, v. 17, n. 1, p. 200, 2024.

CAICEDO, E.-Y.; CHARNIGA, K.; RUEDA, A.; DORIGATTI, I. *et al.* The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009418, 2021.

CARVALHO, C. A.; SILVA, J. L.; OLIVEIRA, A. C.; GOMES, A. M. On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. **PeerJ**, 5, p. e3245, 2017.

CELONE, M.; OKECH, B.; HAN, B. A.; FORSHEY, B. M. *et al.* A systematic review and meta-analysis of the potential non-human animal reservoirs and arthropod vectors of the Mayaro virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 12, p. e0010016, 2021.

CIRNE-SANTOS, C. C.; BARROS, C. d. S.; GOMES, M. W.; GOMES, R. *et al.* In vitro antiviral activity against zika virus from a natural product of the Brazilian brown seaweed *Dictyota menstrualis*. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 7, p. 1934578X19859128, 2019.

CIRNE-SANTOS, C. C.; DE SOUZA BARROS, C.; DE OLIVEIRA, M. C.; RABELO, V. W.-H. *et al.* In vitro studies on the inhibition of replication of Zika and Chikungunya viruses by dolastane isolated from seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 8263, 2020

CIRNE-SANTOS, C. C.; DE SOUZA BARROS, C.; ESTEVES, P. O.; GOMES, M. W. L. *et al.* Antiviral activity against chikungunya virus of diterpenes from the seaweed *Dictyota menstrualis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 30, n. 5, p. 709-714, 2020a.

CORRÊA-AMORIM, L. d. S.; ROCHA, N. C. d.; BARBOZA, G. K. P.; CARLOS, M. F. *et al.* Discovery of Synthetic Imine-Chalcones Targeting Mayaro Virus Replication. **Pathogens**, v. 15, n. 5, p. 529, 2026.

DA CRUZ, A. F. G.; REIS, A. C. C.; SOUSA, J. A. C.; VAZ, L. B. A. *et al.* High-resolution mass spectrometry identification and characterization of flavonoids from *Fridericia chica* leaves extract with anti-arbovirus activity. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 6043, 2022.

DA SILVA CAETANO, C. C.; CAMINI, F. C.; ALMEIDA, L. T.; FERRAZ, A. C. *et al.* Mayaro virus induction of oxidative stress is associated with liver pathology in a non-lethal mouse model. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 15289, 2019.

DA SILVA, M. O. L.; FIGUEIREDO, C. M.; NERIS, R. L. S.; GUIMARÃES-ANDRADE, I. P. *et al.* Chikungunya and Mayaro viruses induce chronic skeletal muscle atrophy triggered by

pro-inflammatory and oxidative response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 16, p. 8909, 2024.

DA SILVA, S. J. R.; KROKOVSKY, L. J. R. i. M. V. Clinical and laboratory diagnosis of Mayaro virus (MAYV): Current status and opportunities for further development. **Reviews in Medical Virology**, v. 34, n. 2, p. e2528, 2024.

DE ARAÚJO, S.; DE MELO COSTA, V. R.; SANTOS, F. M.; DE SOUSA, C. D. F. *et al.* Annexin A1-FPR2/ALX signaling Axis regulates acute inflammation during chikungunya virus infection. **Cells**, v. 11, n. 17, p. 2717, 2022..

DE BARROS, E. R.; PIRES, R. M. T.; AMORIM, M. T.; HOLANDA, G. M. J. R.-R. C. M.-I.-. EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS MAYARO NA AMÉRICA LATINA ENTRE 2009 A 2019. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 2, n. 5, p. e25327-e25327, 2021.

DE CASTRO BARBOSA, E.; ALVES, T. M. A.; KOHLHOFF, M.; JANGOLA, S. T. G. *et al.* Emerson et al. Searching for plant-derived antivirals against dengue virus and Zika virus. **Virology journal**, v. 19, n. 1, p. 31, 2022.

DE FÁTIMA NUNES, D. A.; LOPES, G. F. M.; DA CRUZ NIZER, W. S.; DE AGUILAR, M. G. *et al.* Virucidal antiviral activity of Maytenus quadrangulata extract against Mayaro virus: Evidence for the presence of catechins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 311, p. 116436, 2023.

DE OLIVEIRA SOUZA, R.; DUARTE JUNIOR, J. W. B.; DELLA CASA, V. S.; SANTORO ROSA, D. *et al.* Unraveling the complex interplay: immunopathology and immune evasion strategies of alphaviruses with emphasis on neurological implications. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, p. 1421571, 2024.

DE SOUZA, W. M.; LECUIT, M.; WEAVER, S. C. Chikungunya virus and other emerging arthritogenic alphaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-17, 2025.

DELSHADI, R.; BAHRAMI, A.; MCCLEMENTS, D. J.; MOORE, M. D. *et al.* Development of nanoparticle-delivery systems for antiviral agents: A review. **Journal of controlled release**, v. 331, p. 30-44, 2021.

DIAGNE, C. T.; BENGUE, M.; CHOUMET, V.; HAMEL, R. *et al.* Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. **Pathogens**, 9, n. 9, p. 738, 2020..

DOMINGOS, Giovana Mesquita Oliveira de Castro. Avaliação dos mecanismo de ação antiviral da silimarina contra o vírus Mayaro em células Vero. 2024. 38 f. **Monografia** (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2024.

DOS SANTOS-RODRIGUES, A.; PEREIRA, M. R.; BRITO, R.; DE OLIVEIRA, N. A. *et al.* Adenosine transporters and receptors: key elements for retinal function and neuroprotection. *In: Vitamins & Hormones*: Elsevier, 2015. v. 98, p. 487-523.

DOS SANTOS, T. C.; OBANDO, J. M. C.; MARTINS, R. C. C.; ALVES, M. A. *et al.* Perfil químico por CLUE-EMAR e atividade antifúngica e antioxidante da macroalga marinha Dictyota menstrualis. **Revista Virtual de Química**, v. 16, n. 1, 2024.

FEYZI, K.; MOUSAVI, F. S.; ABBASI, S. J. R. i. M. V. Pathogen-Specific Evasion of Innate Immunity by Alphaviruses (CHIKV, VEEV, and SINV). **Reviews in Medical Virology**, v. 36, n. 4, p. e70174, 2026.

FIGUEIREDO, C. M.; NERIS, R. L. d. S.; GAVINO-LEOPOLDINO, D.; DA SILVA, M. O. L. *et al.* Mayaro virus replication restriction and induction of muscular inflammation in mice are dependent on age, type-I interferon response, and adaptive immunity. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2246, 2019.

FORATO, J.; MEIRA, C. A.; CLARO, I. M.; AMORIM, M. R. *et al.* Molecular epidemiology of Mayaro virus among febrile patients, Roraima State, Brazil, 2018–2021. **Emerging infectious diseases**, v. 30, n. 5, p. 1013, 2024.

GEDDES, V. E. V.; BRUSTOLINI, O. J. B.; CAVALCANTE, L. T. d. F.; MOREIRA, F. R. R. *et al.* Common dysregulation of innate immunity pathways in human primary astrocytes infected with Chikungunya, Mayaro, Oropouche, and Zika viruses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 641261, 2021.

GEURS, Theresa L. *et al.* Sex differences in murine susceptibility to systemic viral infections. **Journal of autoimmunity**, v. 38, n. 2-3, p. J245-J253, 2012.

GOULD, E.; COUTARD, B.; MALET, H.; MORIN, B. *et al.* Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral research**, v. 87, n. 2, p. 111-124, 2010..

HPS, A. K.; GIUMA, A.; YAHYA, E. B.; SURYA, I. *et al.* Microwave-assisted sodium alginate extraction from *Dictyota menstrualis* and the fabrication of green thermal insulators. **Express Polymer Letters**, v. 18, n. 8, p. 796-806, 2024..

KAFAL, N. M.; DIAMOND, M. S.; FOX, J. M. J. A. r. o. i. Distinct cellular tropism and immune responses to alphavirus infection. **Annual review of immunology**, v. 40, p. 615-649, 2022.

KAUSAR, S.; SAID KHAN, F.; ISHAQ MUJEEB UR REHMAN, M.; AKRAM, M. *et al.* A review: Mechanism of action of antiviral drugs. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 35, p. 20587384211002621, 2021..

KROKOVSKY, L.; LINS, C. R. B.; GUEDES, D. R. D.; WALLAU, G. d. L. *et al.* Dynamic of Mayaro virus transmission in *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* mosquitoes, and a mice model. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 799, 2023.

KUMAR, N.; SANTHOSHKUMAR, R.; VENKATASWAMY, M. M. J. F. i. C.; MICROBIOLOGY, I. Chikungunya virus infection in human microglial C20 cells induces mitochondria-mediated apoptosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 14, p. 1380736, 2024.

KUMAR, N.; SHARMA, S.; KUMAR, R.; TRIPATHI, B. N. *et al.* Host-directed antiviral therapy. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 3, p. 10.1128/cmr. 00168-19, 2020.

KUMARI, R.; SHARMA, S. D.; KUMAR, A.; ENDE, Z. *et al.* Antiviral approaches against influenza virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 36, n. 1, p. e00040-22, 2023.

LIMA, R. L. S.; COELHO FERRAZ, A.; BUENO DA SILVA MENEGATTO, M. I.; SAMUEL OLA-OLU, O. *et al.* Silymarin Attenuates Arthritis and Myositis in a Murine Model of Acute Infection by Chikungunya and Mayaro Viruses. **ACS Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 738-749, 2026.

LOPES, G. F.; LIMA, W. G.; SANTOS, F. R.; NUNES, D. A. *et al.* Anti-Mayaro virus activity of a hydroethanolic extract from *Fridericia chica* (Bonpl.) LG Lohmann leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 299, p. 115685, 2022.

LU, L.; SU, S.; YANG, H.; JIANG, S. J. C. Antivirals with common targets against highly pathogenic viruses. **Cell**, v. 184, n. 6, p. 1604-1620, 2021.

MARINHO, M. d. S.; FERREIRA, G. M.; GROSCHE, V. R.; NICOLAU-JUNIOR, N. *et al.* Evolutionary profile of Mayaro virus in the Americas: an update into genome variability. **Viruses**, 16, n. 5, p. 809, 2024.

MARQUES, R. E.; SHIMIZU, J. F.; NOGUEIRA, M. L.; VASILAKIS, N. J. E. o. o. t. t. Current challenges in the discovery of treatments against Mayaro fever. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 28, n. 5, p. 345-356, 2024.

MARTINS-FILHO, P. R.; CARVALHO, T. A.; DOS SANTOS, C. A. J. J. o. T. M. Mayaro fever in Brazil from 2014 to 2024. **Journal of Travel Medicine**, v. 31, n. 7, p. taae105, 2024.

MELLO, M. V.; DOMINGOS, T. F.; FERREIRA, D. F.; RIBEIRO, M. M. *et al.* Antiviral Drug Discovery and Development for Mayaro Fever—What do we have so far?. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 921-928, 2020.

MENDONÇA, D. C.; REIS, E. V.; ARIAS, N. E.; VALENCIA, H. J. *et al.* A study of the MAYV replication cycle: Correlation between the kinetics of viral multiplication and viral morphogenesis. **Virus Research**, v. 323, p. 199002, 2023.

MOTA, M. T. d. O.; COSTA, V. V.; SUGIMOTO, M. A.; GUIMARÃES, G. d. F. *et al.* In-depth characterization of a novel live-attenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 5306, 2020.

MUSARRA-PIZZO, M.; PENNISI, R.; BEN-AMOR, I.; MANDALARI, G. *et al.* Antiviral activity exerted by natural products against human viruses. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 828, 2021.

NINLAOR, T.; ITHARAT, A.; RUANGNOO, S.; THONGDEEYING, P. *et al.* Cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts of Pra-Sa-Ka-Phrao remedy and its plant components. **The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 4, 2025.

OBANDO, J. M. C.; DOS SANTOS, T. C.; BERNARDES, M.; NASCIMENTO, N. *et al.* Chemical variation and analysis of diterpenes from seaweed *Dictyota menstrualis* under controlled conditions. **Algal Research**, v. 62, p. 102637, 2022

OBANDO, J. M. C.; GARCÍA-LÓPEZ, J. P.; CARUFFO, M.; DOS SANTOS, T. C. *et al.* Anti-inflammatory potential of diterpene-concentrated fractions from seaweed *Dictyota menstrualis* in zebrafish model. **Algal Research**, p. 104212, 2025.

PASCHOALINO, M.; MARINHO, M. d. S.; SANTOS, I. A.; GROSCHE, V. R. *et al.* An update on the development of antiviral against Mayaro virus: from molecules to potential viral targets. **Archives of Microbiology**, 205, n. 4, p. 106, 2023.

PEZZI, L.; DIALLO, M.; ROSA-FREITAS, M.; VEGA-RUA, A. *et al.* GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 5: Entomological aspects. **Antiviral research**, v. 174, p. 104670, 2020.

PINHEIRO, F. P.; LEDUC, J. W. J. T. a. e.; ECOLOGY. Mayaro virus disease. **The arboviruses: epidemiology and ecology**, v. 3, p. 137-50, 1998.

REIMBERG, A. A.; SANTOS, G. F.; DA SILVA, E. G. V.; SIMÕES, E. *et al.* Desenvolvimento de VLPs (vírus like particle) como potencial vacina recombinante contra o vírus da

dengue (DENV). **Research, Society and Development**, v. 12, n. 13, p. e92121344384-e92121344384, 2023.

ROSA, R. B.; CASTRO, E. F. d.; SANTOS, D. d. O.; DANTAS, W. M. *et al.* A comprehensive murine clinical model for development of countermeasures and studying Mayaro virus infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 19, n. 7, p. e0013333, 2025.

ROSA, R. B.; DE CASTRO, E. F.; DE OLIVEIRA SANTOS, D.; DA SILVA, M. V. *et al.* Mouse models of Mayaro virus. **Viruses**, v. 15, n. 9, p. 1803, 2023.

SALLES, T. S.; MENESES, M. D. F.; CALDAS, L. A.; SÁ-GUIMARÃES, T. E. *et al.* Virucidal and antiviral activities of pomegranate (*Punica granatum*) extract against the mosquito-borne Mayaro virus. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 443, 2021.

SANTOS, F. M.; DIAS, R. S.; DE OLIVEIRA, M. D.; COSTA, I. C. T. A. *et al.* Modelo animal de artrite e miosite induzidas pelo vírus Mayaro. **PLoS neglected tropical diseases** , v. 13, n. 5, p. e0007375, 2019.

SCHEPERS, Koen; ARENS, Ramon; SCHUMACHER, Ton NM. Dissection of cytotoxic and helper T cell responses. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 23, p. 2695-2710, 2005..

SILVA, Amália Luíza. Caracterização química de flavonoides presentes no extrato etanólico de caules e folhas de *Luxemburgia polyandra* (Ochnaceae) e avaliação da atividade antiviral frente a arbovírus. 2025. 59 f. **Monografia** (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2025.

SILVA, J. W. P. Vírus Mayaro: Desafios e perspectivas na saúde pública das Américas. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, 6(7), 21–35. <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n7p21-35>. 2024.

SILVA, M. G. E.; MELO, K. F. L.; CASSEB, S. M.; SILVA, E. V. *et al.* Heterologous interference between Mayaro and Chikungunya viruses in Vero cells. **Indian Journal of Medical Microbiology**, p. 100891, 2025.

SRIDHAR, S.; TONTO, P. B.; LUMKONG, L.; NETTO, E. M. *et al.* RT-RPA as a dual tool for detection and phylogenetic analysis of epidemic arthritogenic alphaviruses. **Scientific reports**, 14, n. 1, p. 30134, 2024.

TORRES, TORRES, Jaime R. *et al.* Epidemiology, diagnosis and treatment of Mayaro and Oropouche virus infections: implication for clinical practice and public health. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)**, p. 503055, 2026.

VALDÉS TORRES, P. A. Caracterización de la infección del virus Mayaro en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y evaluación de rocaglatos como agentes antivirales. **Dissertação** (Mestrado) – Universidad de Panamá, Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, 2025. Disponível em: <https://up-rid.up.ac.pa/9765/1/patricia_valdes.pdf>. Acesso em: 2026.

VALENTE, Gabriel Mendonça. Estudo fitoquímico, avaliação da atividade citotóxica e antiviral do extrato da espécie *Bidens pilosa* contra Chikungunya, Mayaro e Zika vírus. 2022. 53 f. **Monografia** (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2022.

WEBER, W. C.; LABRIOLA, C. S.; KREKLYWICH, C. N.; RAY, K. *et al.* Mayaro virus pathogenesis and immunity in rhesus macaques. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 17, n. 11, p. e0011742, 2023.

WEI, L. L. L.; TOM, R.; KIM, Y. C. J. V. Mayaro virus: An emerging alphavirus in the Americas. **Viruses**, v. 16, n. 8, p. 1297, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Mayaro virus disease – French Guiana, France. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/mayaro-virus-disease---french-guiana-france>>. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Acesso em: 2026.

YADAV, R.; JHA, M.; PRASAD, S.; JAT, D. *et al.* Mayaro virus (MAYV) Disease: Past, present and future. **J Pharm Biol Sci**, v. 10, n. 1, p. 7-16, 2022.

YASUHARA-BELL, J.; YANG, Y.; BARLOW, R.; TRAPIDO-ROSENTHAL, H. *et al.* In vitro evaluation of marine-microorganism extracts for anti-viral activity. **Virol J**, 7, p. 182, 2010.

ZHANG, R.; KIM, A. S.; FOX, J. M.; NAIR, S. *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, 557, n. 7706, p. 570-574, 2018.