

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos

---

Dissertação

---

**Avaliação da atividade antioxidante e antiviral da Silimarina e N-acetilcisteína em camundongos C57BL/6 infectados com o vírus Zika e o papel das espécies reativas de oxigênio na multiplicação viral.**

*Rafaela Lameira Souza Lima*

Ouro Preto

2021



**UFOP**



UFOP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRORGANISMOS



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIVIRAL DA  
SILIMARINA E N-ACETILCISTEÍNA EM CAMUNDONGOS C57BL/6  
INFECTADOS COM O VÍRUS ZIKA E O PAPEL DA ESPÉCIES  
REATIVAS DE OXIGÊNIO NA MULTIPLICAÇÃO VIRAL**

**RAFAELA LAMEIRA SOUZA LIMA**

**ORIENTAÇÃO: PROF<sup>a</sup> CINTIA LOPES DE BRITO MAGALHÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

Ouro Preto, MG

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L732a Lima, Rafaela Lameira Souza .  
Avaliação da atividade antioxidante e antiviral da silimarina e N-acetilcisteína em camundongos C57BL/6 infectados com o vírus zika e o papel da espécies reativas de oxigênio na multiplicação viral.  
[manuscrito] / Rafaela Lameira Souza Lima. - 2021.  
100 f.: il.: color., gráf., tab., mapa.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.  
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Vírus da Zika. 2. Agentes antivirais. 3. Stress oxidativo. 4. Antioxidantes. 5. Arbovírus. I. Magalhães, Cintia Lopes de Brito. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.2

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Rafaela Lameira Souza Lima**

**Avaliação da atividade antioxidante e antiviral da Silimarina e N- acetilcisteína  
em camundongos C57BL/6 infectados com o vírus Zika e o papel  
das “Espécies Reativas de Oxigênio” na multiplicação viral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Aprovada em 27 de outubro de 2021

### Membros da banca

Doutora Cintia Lopes de Brito Magalhães - Orientador(a) (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Doutora Daniela Caldeira Costa Calsavara (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Doutor Geraldo Célio Brandão (Universidade Federal de Ouro Preto)

Cintia Lopes de Brito Magalhães, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 06/12/2021



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Lopes de Brito Magalhaes, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/12/2021, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0254585** e o código CRC **C5E94113**.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Professora Cintia pela oportunidade e pela excelente orientação. Seu apoio foi determinante para a concretização deste trabalho e meu amadurecimento e crescimento profissional.

Aos meus pais, Ana Paula e Fabiano, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Sem vocês nada disso seria possível! Amo muito vocês!

A toda minha família, em especial minha irmã Nicole e avó Sônia, por sempre estarem ao meu lado. Amo vocês!

A todos os colegas do LBTM, em especial minhas amigas Letícia, Marília e Ariane, por todo incentivo, aprendizado e carinho. Eu aprendi e cresci muito com vocês, meninas! Obrigada!

Ao Lucas e sua família pelo acolhimento e apoio, vocês foram essenciais!

Aos meus amigos por sempre me apoiarem e torcerem por mim, em especial Kamyła, Stefanie, Giuliana e a minha segunda casa, Alquimia.

A FAPEMIG, ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Ouro Preto, NUPEB e ao programa de mestrado em Ciências Biológicas pela oportunidade e ensino de qualidade.

## RESUMO

O Zika virus (ZIKV) é um arbovírus que pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Os principais sintomas causados pela infecção por ZIKV são febre, exantema, artralgia, mialgia, conjuntivite e cefaleia. No entanto, estudos têm demonstrado a possível ligação entre a infecção por ZIKV e alguns distúrbios neurológicos, como microcefalia em bebês e síndrome de Guillian-Barré em adultos. Embora essa arbovirose seja de grande importância para a Saúde Pública nacional, apresentando quadros debilitantes, até o momento não existem fármacos e/ou vacinas disponíveis para o tratamento da doença. Nesse sentido, uma vez que nosso grupo de pesquisa já demonstrou que o estresse oxidativo ocorre na infecção por ZIKV tanto *in vitro* como *in vivo* e que a Silimarina, um fitoterápico com ação antioxidante e anti-inflamatória bem conhecida, tem ação antiviral contra o vírus *in vitro*, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* a atividade antiviral e antioxidante da Silimarina em camundongos infectados com ZIKV. Além da Silimarina, a N-acetilcisteína (NAC) foi inserida no estudo para verificar se a atividade antioxidante da Silimarina poderia estar associada à atividade antiviral, por meio da comparação com um antioxidante já conhecido que até então não possuía atividade antiviral contra o vírus. Para isso, camundongos C57BL/6 foram infectados via intraperitoneal com  $10^8$  (dez elevado a 8) Unidades Formadoras de Placa (UFP) do ZIKV e divididos em 6 grupos, sendo eles: grupo controle (C); grupo controle + silimarina (CSIL); grupo infectado (V); grupo infectado + silimarina (VSIL); grupo controle + NAC (CNAC); grupo infectado + NAC (VNAC). Os animais tratados com Silimarina receberam 200mg/kg/dia, enquanto os tratados com NAC 300mg/kg/dia via gavagem, de 12/12 horas, sendo que os tratamentos se iniciaram 24h antes da infecção. Após 3 dias da infecção, os animais foram eutanasiados e no fígado dos camundongos foram mensurados os biomarcadores de estresse oxidativo, assim como as enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT). Ainda, a carga viral foi avaliada no fígado. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com a Silimarina e NAC se mostrou promissor no restabelecimento dos parâmetros redox no fígado de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV e ambos compostos apresentaram atividade antiviral, reduzindo a carga viral no fígado de camundongos infectados. Como os dois compostos apresentaram atividade antiviral, o próximo objetivo foi avaliar *in vitro* se todo antioxidante para ZIKV poderia também ser um antiviral. Para isso, além da Silimarina e NAC, foram testados os antioxidantes Quercetina e Rutina. Para a realização desses experimentos foram utilizadas células Vero, infectadas com ZIKV em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5 e tratadas com diferentes concentrações dos compostos. Os resultados *in vitro* mostraram que todos os compostos testados exerceram efeito antioxidante por inibirem a produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) após a infecção. No entanto, somente a Silimarina apresentou atividade anti-ZIKV, confirmando estudos prévios do grupo. Assim, nossos resultados indicam que a multiplicação do ZIKV parece não depender das ERO uma vez que a atividade antioxidante dos compostos não necessariamente resultou em efeito antiviral. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese. Em conjunto, os resultados obtidos reforçam o potencial do efeito antiviral e antioxidante da Silimarina na infecção pelo ZIKV e abrem perspectivas do seu uso como abordagem farmacológica.

## ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the *Flaviviridae* family and the genus *flavivirus*, transmitted mainly by mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. The main symptoms caused by ZIKV infection are fever, rash, arthralgia, myalgia, conjunctivitis and headache. However, studies have shown a possible link between Zika virus infection and some neurological disorders, for example microcephaly in babies and Guillian-Barré syndrome in adults. Although this arbovirus is of great importance to national public health, presenting debilitating conditions, such as neurological manifestations, until that moment there are no drugs or vaccines available for the treatment of the disease. In this sense, since our research group has already demonstrated that oxidative stress occurs in ZIKV infection both *in vitro* and *in vivo* and that Silymarin, a well-known herbal medicine with antioxidant and anti-inflammatory action, has antiviral action against the virus *in vitro*, the main objective was to evaluate the antiviral and antioxidant activity of silymarin in a murine model (*in vivo*) infected by Zika virus. In addition to silymarin, N-acetylcysteine (NAC) was included in the study to verify whether the antioxidant activity of silymarin could be associated with antiviral activity, by comparing it with an already known antioxidant that so far had no antiviral activity against the virus. For this, C57BL/6 mice were intraperitoneally infected with  $10^8$  (ten to 8) ZIKV Plaque Forming Units (PFU) and divided into 6 groups, namely: control group (C); control group + Silymarin (CSIL); infected group (V); infected group + Silymarin (VSIL); control group + NAC (CNAC); infected group + NAC (VNAC). The animals treated with silymarin received 200mg/kg/day, while those treated with NAC 300mg/kg/day with gavage, 12/12 hours, and treatments were started 24h before infection. After 3 days of infection, the animals were euthanized and the liver of the mice were measured for oxidative stress biomarkers, as well as the antioxidant enzymes Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT). Moreover, viral load was assessed in the liver. Our results showed that treatment with silymarin and NAC showed promise in reestablishing the redox parameters in the liver of C57BL/6 mice infected with ZIKV and both compounds showed antiviral activity, reducing the viral load in the liver of infected mice. As both compounds showed antiviral activity, the next objective was to evaluate *in vitro* whether every antioxidant for ZIKV could also be an antiviral. For this, in addition to Silymarin and NAC, the antioxidants Quercetin and Rutin were tested. To carry out these experiments, Vero cells, infected with ZIKV at a multiplicity of infection (MOI) of 5, treated with different concentrations of the compounds. The *in vitro* results showed that all tested compounds exerted an antioxidant effect by inhibiting the production of "Reactive Oxygen Species" (ROS) after infection. However, only silymarin showed anti-ZIKV activity, confirming the group's previous studies. Thus, our results indicate that ZIKV multiplication does not seem to depend on ROS since the antioxidant activity of the compounds did not necessarily result in an antiviral effect. However, more studies need to be carried out to confirm this hypothesis. Together, the results obtained reinforce the potential of the antiviral and antioxidant effect of Silymarin in ZIKV infection and open perspectives for its use as a pharmacological approach.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**BSA** - Albumina do soro bovino  
**C** - Grupo Controle  
**CAT** - Catalase  
**CC** - Grupo controle de células  
**CCA** - Centro de Ciência Animal  
**cDNA** - DNA complementar  
**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais  
**CHIKV** - Vírus Chikungunya  
**CMC** - Carboximetilcelulose  
**CNAC** - Grupo controle + NAC  
**CQUER** - Grupo controle + Quercetina  
**CRUT** - Grupo controle + Rutina  
**CSIL** - Grupo controle + Silimarina  
**CV** - Controle de vírus  
**DENV** - Vírus da Dengue  
**DMEM** - Meio Dulbecco's Modified Eagle  
**DMSO** - Dimetilsulfóxido  
**DNP** - Dinitrofenilhidrazona  
**DNPH** - 2,4- Dinitrofenilhidrazina  
**E** - Envelope viral  
**ERO** - Espécies reativas de oxigênio  
**PGx** - Glutathione peroxidase  
**GSH** - Glutathione Total  
**H5N1** - Influenza aviária A  
**H3N2** - Influenza A subtipo H3N2  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio  
**HBSS** - Solução Salina Equilibrada de Hanks  
**HBV** - Vírus da Hepatite B  
**HCV** - Vírus da Hepatite C  
**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana  
**Hpi** - Horas pós-infecção

**IFN1** - Interferon tipo I  
**JEV** - Vírus da Encefalite Japonesa  
**µM** - micromolar  
**MAYV** - Vírus Mayaro  
**MDA** - Malondialdeído  
**MOI** - Multiplicidade de infecção  
**MTT** - (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)  
**NAC** - N-acetilcisteína  
**Nrf2** - Fator de transcrição (eritróide-2)- fator 2  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - Ânion superóxido  
**OH<sup>•</sup>** - Radical hidroxil  
**ORF** - Janela única de leitura  
**PrM** - Proteína pré-membrana viral  
**PBS** - Phosphate buffered saline  
**QUER** - Quercetina  
**RNA<sub>m</sub>** - RNA mensageiro  
**RSV** - Vírus Respiratório Sincicial  
**RUT** - Rutina  
**RVFV** - Vírus da Febre do Vale do Rift  
**SCZ** - Síndrome congênita do Zika  
**SDS** - Dodecil sulfato de sódio  
**SFB** - Soro fetal bovino  
**SGB** - Síndrome de Guillian-Barré  
**SIL** - Silmarina  
**SOD** - Superóxido dismutase  
**TBARS** - Ácido tiobarbitúrico  
**TCA** - Ácido tricloroacético  
**UFP** - Unidades formadoras de placa  
**V** - Grupo infectado  
**VSIL** - Grupo infectado + Silimarina  
**WNV** - Vírus do Oeste do Nilo  
**YFV** - Vírus da Febre Amarela

**ZIKV** - Vírus Zika

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1:** Curva de calibração com padrão MDA para dosagem de TBARS.....38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico dos arbovírus.....	6
<b>Figura 2:</b> Distribuição espacial de taxa de detecção de Dengue, Zika e Chikungunya por biologia molecular, Brasil, 2019.....	8
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática de uma partícula de <i>Flavivirus</i> .....	11
<b>Figura 4:</b> Genoma dos <i>Flavivirus</i> .....	12
<b>Figura 5:</b> Ciclo de multiplicação dos <i>Flavivirus</i> .....	13
<b>Figura 6:</b> Reação catalisada pela enzima SOD.....	18
<b>Figura 7:</b> Reação catalisada pela enzima CAT.....	19
<b>Figura 8:</b> Estrutura da Silimarina.....	23
<b>Figura 9:</b> Silimarina e suas várias ações.....	25
<b>Figura 10:</b> Estrutura da N-acetilcisteína (NAC).....	26
<b>Figura 11:</b> Estrutura da Rutina. ....	27
<b>Figura 12:</b> Estrutura da Quercetina.....	29
<b>Figura 13:</b> Desenho experimental da etapa <i>in vivo</i> .....	36
<b>Figura 14:</b> Porcentagem de ganho de massa corporal de animais controles e infectados. ....	46
<b>Figura 15:</b> Tratamento com Silimarina e NAC não restaura a porcentagem de ganho de massa corporal em camundongos C57BL/6 3 dias após infecção por ZIKV.....	46
<b>Figura 16:</b> Razão da massa do baço e fígado em relação à massa corporal de animais C57BL/6 infectados com ZIKV e tratados com Silimarina e NAC. ....	47
<b>Figura 17:</b> Tratamento com Silimarina restabelece os níveis de MDA no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV.....	48
<b>Figura 18:</b> Tratamento com Silimarina e NAC restabelece os níveis de proteína carbonilada no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV.....	49
<b>Figura 19:</b> O tratamento com Silimarina e NAC restabeleceu a atividade enzimática da SOD no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV.....	50
<b>Figura 20:</b> O tratamento com Silimarina e NAC restabeleceu a atividade enzimática da CAT no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV.....	51
<b>Figura 21:</b> A carga viral no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV é reduzida após tratamento com Silimarina e também por NAC.....	52
<b>Figura 22:</b> Diminuição das ERO em células infectadas com ZIKV e tratadas com Silimarina, NAC, Quercetina e Rutina.....	53
<b>Figura 23:</b> Título de ZIKV em células Vero tratadas com diferentes compostos após 24 e 48 horas pós-infecção (hpi).....	55
<b>Figura 24:</b> Viabilidade celular de células Vero infectadas com o ZIKV e tratadas com diferentes compostos.....	56

## SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE TABELA	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1- INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 - Arbovírus	5
2.2- Família <i>Flaviviridae</i> , gênero <i>Flavivirus</i>	9
2.3 - <i>Zika virus</i>	13
2.4 - Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Estresse Oxidativo	16
2.5 - Estresse oxidativo e infecções virais	20
2.6 - Silimarina	22
2.7 - N - acetilcisteína (NAC)	25
2.8 - Rutina	26
2.9 - Quercetina	28
3 - OBJETIVOS	31
3.1 - Geral	31
3.2 - Específicos	31
4 - MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 - Vírus e Células	32
4.2 - Multiplicação e Titulação do vírus	32
4.3 - Animais	33
4.4 - Compostos utilizados <i>in vivo</i>	34
4.4.1 - Silimarina	34
4.4.2 - N-acetilcisteína	34
4.5 - Infecção experimental de camundongos C57BL/6	34
4.6 - Avaliação de Hepatomegalia e Esplenomegalia	36
4.7 - Dosagem dos biomarcadores de estresse oxidativo	37
4.7.1 - Ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	37
4.7.2 - Ensaio de Proteína Carbonilada	38
	xiii

4.8 - Dosagem das defesas antioxidantes	39
4.8.1 – Atividade total da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	39
4.8.2 – Atividade da enzima Catalase (CAT)	40
4.9 - Dosagem de proteínas totais	41
4.10 - Titulação de vírus do fígado de camundongos C57BL/6	41
4.11 - Compostos utilizados nos ensaios <i>in vitro</i>	42
4.12 - Avaliação do <i>status</i> oxidante <i>in vitro</i>	42
4.12.1 - Dosagem das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	42
4.13 - Ensaio de Atividade Antiviral	43
4.13.1 - Avaliação da viabilidade celular por MTT	44
4.14 - Análise estatística	44
5 - RESULTADOS	45
5.1 - Sinais clínicos	45
5.1.1 - Avaliação da massa corporal de camundongos C57BL/6	45
5.2 - Análise de Esplenomegalia e Hepatomegalia	47
5.3 - Análise da ação antioxidante da Silimarina e da NAC	48
5.3.1 - Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo no fígado	48
5.3.1.1 - Malondialdeído (MDA)	48
5.3.1.2 - Proteína Carbonilada	49
5.3.2 - Avaliação do <i>status</i> antioxidante no fígado dos animais	50
5.3.2.1 - Atividade da enzima Superóxido Dismutase	50
5.3.2.2 - Atividade da enzima Catalase	51
5.4 - Análise da atividade antiviral da Silimarina e da N-acetilcisteína	52
5.4.1 - Titulação do fígado de camundongos C57BL/6	52
5.5 - Avaliação da atividade antioxidante e antiviral da Silimarina, NAC, Quercetina e Rutina na infecção <i>in vitro</i> pelo ZIKV	53
5.5.1 – Avaliação da atividade antioxidante	53
5.6 - Análise da atividade antiviral	54
5.6.1 - Análise da viabilidade celular por MTT	55
6 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	86

## 1- INTRODUÇÃO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus que pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, sendo transmitido ao homem por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo as principais espécies o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Martínez de Salazar et al., 2016). O ZIKV foi isolado na Floresta de Zika, em Uganda, no ano de 1947, do sangue de um macaco sentinela que apresentava sinais febris (Dick et al., 1952). Os casos de ZIKV mantiveram-se esporádicos e restritos a algumas regiões da África e Ásia, até que em 2007, ocorreu o primeiro grande surto de ZIKV fora dessas regiões. O surto ocorreu na Ilha Yap, na Micronesia, onde pelo menos 75% da população da ilha foi infectada (Wong; Poon; Wong, 2016). Depois disso, houve um grande surto em 2013 na Polinésia Francesa (Musso et al., 2014) e em 2016 no Brasil, em que houveram 165.932 casos suspeitos de Zika, dos quais 66 mil foram confirmados. Entre 2015 e 2016 também foram confirmados casos de ZIKV na Bolívia, Venezuela, Paraguai, Guiana Francesa e Equador (Martínez de Salazar et al., 2016).

A infecção por ZIKV é muito semelhante a outras arboviroses, como Dengue e Chikungunya, dessa forma muitas vezes ocorre a subnotificação dos casos, por um diagnóstico incorreto (Rossi et al., 2016). Geralmente, em 80% dos casos, a infecção por ZIKV é assintomática ou se manifesta como uma doença aguda autolimitada denominada Febre Zika. Os principais sintomas da Febre Zika são febre, artralgia, mialgia, cefaleia, exantema e conjuntivite. O período de incubação varia de 3 a 7 dias e os sintomas tendem a durar menos de uma semana (Macnamara, 1954; Martínez de Salazar et al., 2016; Brasil et al., 2016). Apesar da infecção não causar sintomas ou apresentar sintomas leves, estudos vêm demonstrando uma associação entre a infecção por ZIKV e casos de doenças neurológicas graves, como microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (Rossi et al., 2016). Desse modo, estudos que tendem elucidar a patogênese do ZIKV, assim como a procura por antivirais e vacinas e formas de controle são essenciais.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a infecção *in vitro* pelo ZIKV leva a um aumento na produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) e que o estresse oxidativo ocorre na infecção tanto *in vitro* como *in vivo* (Almeida et

al., 2020), podendo ser um importante fator na patogênese viral. Ainda, demonstramos *in vitro* uma potente ação antiviral da Silimarina contra o vírus (Silva et al., 2020). A Silimarina é um fitoterápico, já comercializado, extraído da planta *Silybum marianum* (*Asteraceae*), popularmente conhecida como “Cardo de leite”, com comprovada ações antioxidante, anti-inflamatória, hepatoprotetora, neuroprotetora e antiviral (Camini; Costa, 2020; Mastron et al., 2015; Karimi et al., 2011; Rambaldi et al., 2005).

Assim, uma vez que ainda não existem fármacos disponíveis para a infecção causada por ZIKV, a Silimarina pode ser um agente promissor no tratamento da doença, auxiliando na melhora no quadro clínico dos pacientes, diminuindo a carga viral e melhorando o *status* redox. Dessa forma, dando continuidade aos estudos do grupo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiviral e antioxidante da Silimarina na infecção *in vivo* pelo ZIKV. Para tal, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, com 21 dias de vida. Um total de 72 animais foram divididos em 6 grupos experimentais (12 animais/grupo), sendo eles: grupo controle (C); grupo controle tratado com Silimarina (CSIL); grupo infectado com o ZIKV (V); grupo infectado e tratado com Silimarina (VSIL); grupo controle tratado com N-acetilcisteína ou NAC (CNAC); grupo infectado e tratado com NAC (VNAC). A N-acetilcisteína (NAC) foi inserida no estudo para comparação com a Silimarina; por sua ação antioxidante já bem descrita na literatura (Vignal et al., 2017; Lara; Oliveira Filho, 1999).

Os animais foram acompanhados diariamente para avaliar a evolução da doença e sinais clínicos. Após 3 dias, os camundongos foram eutanasiados e no fígado foram mensurados os biomarcadores de estresse oxidativo Malondialdeído e Proteína Carbonilada, assim como as enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT). Ainda, a carga viral foi avaliada nesse órgão por titulação.

Nossos resultados mostraram que animais infectados com ZIKV sobreviveram à infecção e apresentaram como único sinal clínico evidente menor ganho de peso, sendo que o tratamento com Silimarina ou NAC não foi capaz de auxiliar o ganho de peso desses animais. De forma semelhante, os animais infectados desenvolveram esplenomegalia e o tratamento com a Silimarina e NAC também não foi capaz de reverter a esplenomegalia observada. Já com relação aos biomarcadores de estresse oxidativo mensurados no fígado, a infecção levou a um aumento nos níveis de MDA

e Proteína Carbonilada e o tratamento com Silimarina foi capaz de diminuir os níveis de ambos os marcadores. Já o tratamento com a NAC diminuiu apenas os níveis de Proteína Carbonilada no fígado dos animais infectados. Com relação aos status antioxidante, a infecção pelo ZIKV levou a um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no fígado dos animais, e o tratamento com ambos os antioxidantes diminuíram seus níveis, comparando-se aos observados no fígado dos animais controles. Assim, nossos resultados até aqui reforçaram o efeito antioxidante já bem documentado de ambos os compostos, Silimarina e NAC.

Uma vez que nosso grupo já demonstrou o efeito antiviral contra o ZIKV da Silimarina em cultura de células (Silva et al., 2020), nós avaliamos se no nosso modelo animal aqui utilizado a Silimarina poderia também diminuir a carga viral. Confirmando nossos achados *in vitro*, a Silimarina diminuiu a quantidade de vírus no fígado dos animais infectados, confirmando seu efeito anti-ZIKV. Para a NAC, não há na literatura nenhum estudo demonstrando seu efeito anti-ZIKV e ela foi aqui usada por sua atividade antioxidante bem documentada. No entanto, de forma não esperada, o tratamento com a NAC também diminuiu a carga viral do ZIKV no fígado dos animais infectados, demonstrando que, de alguma forma, a NAC também apresentou efeito anti-ZIKV no nosso modelo experimental.

Dessa forma, os resultados obtidos no nosso modelo experimental com Silimarina e NAC nos levaram a questionar se inibindo a produção de ERO e consequentemente o estresse oxidativo, qualquer composto antioxidante poderia inibir a multiplicação do ZIKV. Sabe-se que, no contexto das infecções virais, as ERO são importantes por influenciarem tanto o metabolismo celular quanto a multiplicação dos vírus, sendo que, para esse último, as ERO podem atuar favorecendo ou inibindo a multiplicação viral, sendo esse efeito dependente principalmente das células envolvidas e também do tipo de vírus (Camini et al., 2017).

Assim, para melhor compreender o efeito das ERO na multiplicação do ZIKV e se qualquer antioxidante poderia ter um efeito antiviral por inibição dessas espécies, avaliamos em células Vero infectadas e tratadas com diferentes antioxidantes a produção de ERO bem como a atividade antiviral desses compostos. Além da Silimarina e NAC, incluímos a Quercetina e a Rutina, que são também antioxidantes bem descritos, encontrados em diversos alimentos, como chás, cebolas e tomates (Boots; Haenen; Bast, 2008; Hollman et al., 1996; Hertog et al., 1993). Todos os

compostos aqui testados foram capazes de diminuir a produção de ERO após a infecção de células Vero pelo ZIKV, 15 e 24 horas pós-infecção (hpi), confirmando seus efeitos antioxidantes. No entanto, apenas a Silimarina apresentou atividade antiviral contra o ZIKV, 24 e 48 hpi, como já havia sido mostrado por estudos prévios do grupo (Silva et al., 2020), enquanto os demais compostos, incluindo a NAC, não inibiram significativamente a produção de vírus nessas células.

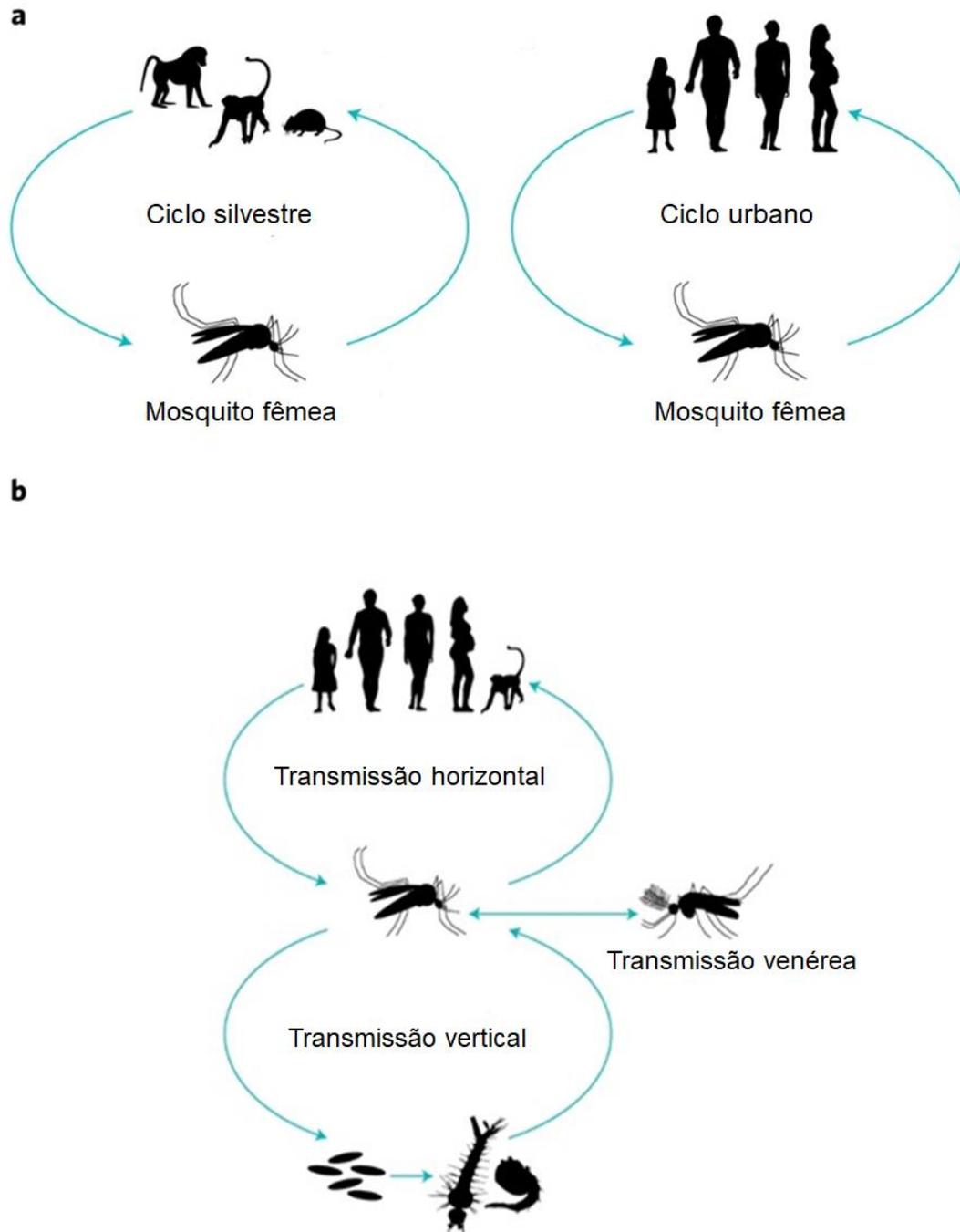
Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho reforçam o potencial efeito antiviral e antioxidante da Silimarina na infecção pelo ZIKV e abrem perspectivas do seu uso como abordagem farmacológica. Além disso, os resultados *in vitro* indicam que a atividade antioxidante da Silimarina e também dos outros compostos não está diretamente ligada a ação antiviral, ou seja, a multiplicação de ZIKV não parece ser diretamente influenciada por ERO, uma vez que somente inibindo essas espécies não há interferência na produção de novas partículas virais. No entanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar essa hipótese, bem como confirmar o efeito anti-ZIKV observado pela NAC *in vivo*.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Arbovírus

O termo arbovírus (“*arthropod-borne virus*”) é utilizado para nomear os vírus transmitidos por meio da picada de um vetor artrópode hematófago, como mosquitos e carrapatos. São vírus que possuem genoma de RNA e grande importância médica, devido aos quadros de febre, febre hemorrágica, febre exantemática e encefalites que podem causar. Presume-se que existam mais de 545 espécies de arbovírus, dos quais cerca de 150 causam doenças em humanos. As principais famílias de arbovírus que causam doenças em humanos e outros mamíferos e aves são *Flaviviridae*, *Peribunyaviridae*, *Togaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Gubler, 2002; Rust, 2012; Cleton et al., 2012; Gubler, 2001).

Os arbovírus possuem um ciclo de transmissão em que os artrópodes (vetores) transmitem o vírus para aves e mamíferos durante o repasto sanguíneo realizado pela fêmea, que necessita do sangue para produção de seus ovos. No ambiente silvestre, a transmissão horizontal ocorre durante a alimentação do sangue de um animal infectado por um vetor. Os animais infectados que transmitem o vírus a um vetor são chamados de hospedeiros amplificadores, pois são susceptíveis a infecção, mantendo níveis circulantes do vírus no sangue por tempo necessário para serem transmitidos a outros vetores. A transmissão também ocorre entre os vetores via transovariana e venérea (Figura 1).



**Figura 1: Ciclo biológico dos arbovírus.** a. Transmissão horizontal dos arbovírus ocorre em dois ciclos distintos: um ciclo silvestre em que o vírus circula entre hospedeiros vertebrados animais (ou seja, provavelmente primatas não humanos, aves e outros mamíferos), e um ciclo urbano no qual o vírus é transmitido aos humanos por mosquitos antropofílicos (como *Ae. aegypti*). b. A transmissão vetorial dos arbovírus ocorre por meio de três padrões principais: transmissão horizontal entre vertebrados e vetores, transmissão vertical de uma fêmea de mosquito infectada para sua progênie e transmissão venérea de uma fêmea infectada para um mosquito macho e vice-versa. Fonte: Adaptado Gutiérrez-Bugallo et al., 2019).

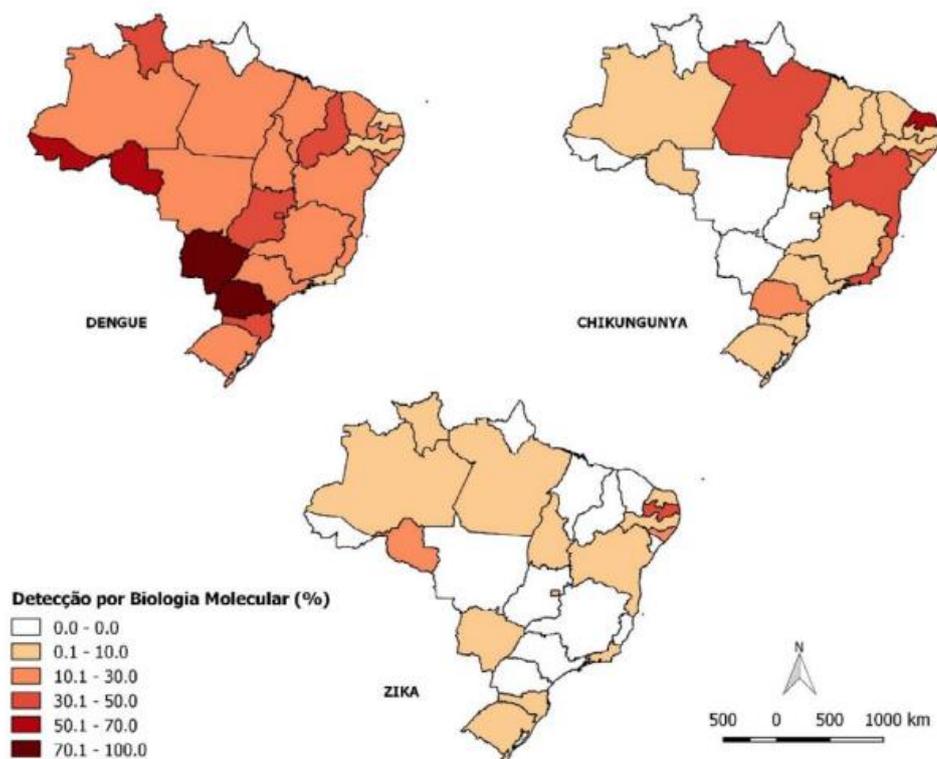
Os principais amplificadores dos arbovírus são aves, mamíferos, roedores e primatas não humanos. Os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais, uma vez que não são necessários para a manutenção do ciclo biológico dos arbovírus na natureza (Gubler; 2002; Donalisio; Freitas; Zuben, 2017).

A infecção em humanos tem se dado devido a mudanças nos padrões de interação entre os vetores e seus hospedeiros (Gould et al., 2017). Essas mudanças ocorreram devido às alterações climáticas, migração populacional, desmatamentos, ocupação desordenada das áreas urbanas e falta de saneamento básico em certas localidades (Rust, 2012). Todos esses fatores estão contribuindo para que as arboviroses estejam cada vez mais presentes nos ambientes urbanos, causando surtos e epidemias (Queiroz; Silva; Heller, 2020).

Outros fatores que vêm contribuindo para surtos e epidemias de arboviroses são a adaptação dos vetores a ambientes urbanos, como é o caso do *Aedes aegypti* (Souza; Ariano; Scopel, 2008) e alta plasticidade genética dos arbovírus, uma vez que possuem genoma de RNA, mais propício a mutações genéticas e assim ao aparecimento de cepas mais virulentas ou melhor adaptadas. Essa última condição pode estar associada a emergência e re-emergência das arboviroses (Figueiredo, 2007).

Os arbovírus possuem uma distribuição geográfica muito extensa, abrangendo diversos continentes que dispõem de regiões temperadas e principalmente as tropicais, que os proporcionam condições ecológicas mais adequadas. Nas regiões temperadas, o ciclo de transmissão é interrompido durante o inverno e volta a se propagar durante a primavera e o verão (Travassos, 1997). O único continente em que esses vírus não são endêmicos é o Antártico (Lopes; Nozawa; Linhares, 2014).

O Brasil está situado em uma área predominantemente tropical, com uma grande variedade de plantas e animais, o que representa um ambiente ideal para a disseminação dos vetores e assim a ocorrência de diversas arboviroses (Figueiredo, 2000). Como podemos ver na Figura 2, os principais arbovírus no Brasil, Dengue, Zika e Chikungunya, apresentam uma extensa distribuição geográfica. Além desses, no país já foram isoladas mais de 210 espécies de arbovírus, sendo 36 relacionadas com doenças em seres humanos (Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, 2019).



**Figura 2: Distribuição espacial de taxa de detecção de Dengue, Zika e Chikungunya por biologia molecular, Brasil, 2019.** Fonte: CGLAB – Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, 2019.

A Floresta Amazônica é uma das maiores reservas no mundo de arbovírus, pois possui condições climáticas favoráveis e também uma grande diversidade de artrópodes hematófagos e vertebrados silvestres, constituindo assim as condições fundamentais para a manutenção do ciclo desses vírus. Na Amazônia já foram isoladas cerca de 196 das 210 espécies de arbovírus identificados no Brasil (Pinheiro; Travassos; Vasconcelos, 1996; Vasconcelos; Travassos; Pinheiro, 1998).

Ainda no Brasil, outros biomas são de grande relevância em relação a arboviroses. Já foram encontrados arbovírus de grande importância epidemiológica nas regiões do Pantanal, Caatinga e Cerrado (Pauvolid- Corrêa et al., 2017; Figueiredo, 2007; Batista et al., 2013).

As manifestações clínicas das arboviroses em seres humanos têm duração de uma a duas semanas, geralmente com evolução benigna. Não obstante, alguns quadros clínicos podem levar à morte ou sequelas, como quadros neurológicos e hemorrágicos. Os sintomas clínicos em humanos podem ser divididos em quatro síndromes, definidas como leves ou graves, doença febril, erupção cutânea e artralgia, síndrome neurológica e síndrome hemorrágica (Cleiton et al., 2012).

A doença febril normalmente apresenta sintomas de gripe, como febre, cefaleia, dor retro-orbital e mialgia. A síndrome neurológica pode-se apresentar como mielite, meningite e/ou encefalite, com alterações comportamentais, paralisia, convulsões e dificuldades motoras. As erupções cutâneas podem ser exantema ou rash do tipo maculopapular e as artralguas podem se tornar poliartralguas e poliartrites, enquanto na síndrome hemorrágica há a presença de petéquias, hemorragias e choque com uma diminuição acentuada de plaquetas (Lopes; Nozawa; Linhares, 2014; Cleton et al.,2012). Outros sintomas como hepatite e conjuntivite também são relatados (Henning, 2004; Cleton et al.,2012).

Logo após a picada do vetor artrópode, o vírus se concentra nos gânglios linfáticos encontrados próximos à região do repasto sanguíneo. Depois de atingir a circulação linfática, esses vírus ganham a corrente sanguínea, onde podem ser disseminados para diversos tecidos do hospedeiro. Nos tecidos, os vírus se multiplicam e novas partículas virais são lançadas na corrente sanguínea. Nesse momento, ocorre a chamada viremia, em que o paciente pode apresentar sintomas febris ou também ser assintomático. Posteriormente, na maior parte dos casos, a infecção regride (Azevedo et al., 2007).

Atualmente ainda não existem fármacos e/ou vacinas disponíveis para arbovírus, sendo o tratamento sintomático. Dessa forma, se faz necessário a busca por antivirais e vacinas para auxiliar no tratamento das arboviroses (Azevedo et al., 2007).

## 2.2- Família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* possui 4 gêneros, contendo 89 espécies de vírus. As partículas são envelopadas e possuem de 40-60 nm, com uma única proteína do core (exceto para o gênero *Pegivirus*) e 2 ou 3 glicoproteínas do envelope. Possuem genomas de RNA de sentido positivo de aproximadamente 9,0 - 13 kb. *Flavivirus* é o gênero mais diverso, com 53 espécies identificadas, depois *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*, respectivamente. A maioria dos hospedeiros da família são aves e mamíferos de todos os gêneros (Simmonds et al., 2017).

Os gêneros mais importantes em relação as infecções que acometem humanos são o *Flavivirus*, em que temos o *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus*

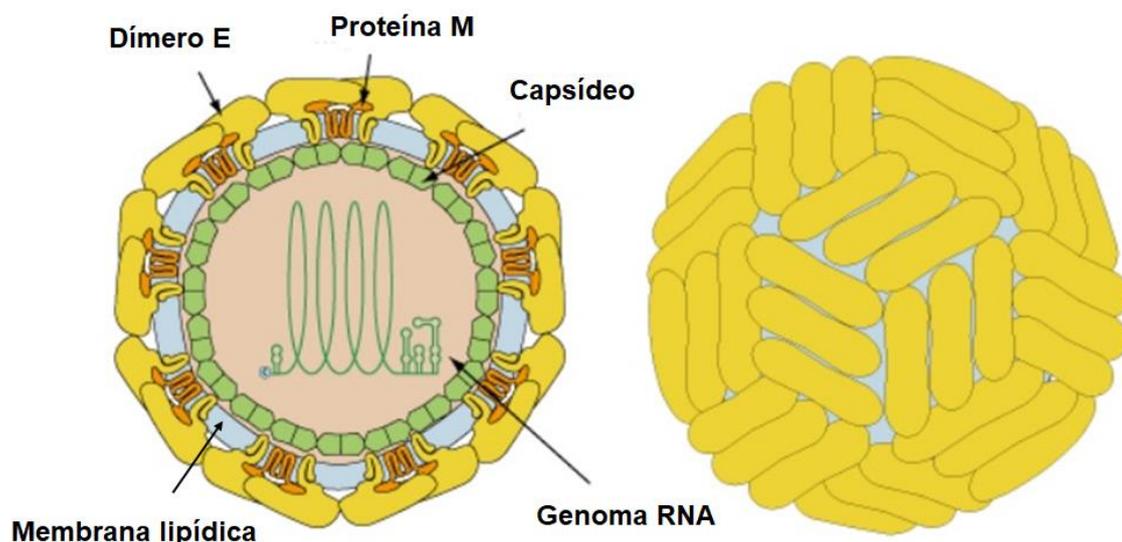
(DENV), *Zika virus* (ZIKV) e *West Nile virus* (WNV) e o *Hepacivirus*, que apresenta o *Hepatitis C virus* (HCV). Os *Pestivirus*, em sua maioria, infectam suínos e ruminantes e são transmitidos por meio do contato com secreções infectadas. As infecções podem ser assintomáticas ou causar doenças entéricas, hemorrágicas ou debilitantes, como é o caso do vírus da diarreia bovina e o vírus da peste suína. Os membros do gênero *Pegivirus* estão associados a infecções persistentes em uma ampla gama de espécies de mamíferos. Eles não foram claramente associados a doenças (Simmonds et al., 2017).

Alguns flavivírus possuem uma limitação em relação a hospedeiros, infectando por exemplo, somente primatas, enquanto outros podem infectar e se multiplicar em uma ampla variedade de espécies (diversos gêneros de mamíferos e aves). Ainda, presume-se que neste gênero exista vírus específicos para artrópodes, como seria o caso do *Aedes flavivirus* (Blitvich; Firth 2015; Haddow et al., 2013; Simmonds et al., 2017).

A maioria dos flavivírus é transmitido por artrópodes como já apresentado no tópico 2.1, em que cerca de 50% são transmitidos por mosquitos, 28% por carrapatos e o restante é transmitido entre roedores e morcegos sem vetores artrópodes conhecidos. Para alguns flavivírus, o ciclo de transmissão ainda não foi identificado (ICTV, 2017).

Grande parte dos flavivírus conhecidos são associados a doenças humanas, incluindo muitos patógenos importantes, como YFV, WNV, DENV, ZIKV, *Japanese encephalitis virus* (JEV) e *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV). Clinicamente as infecções por flavivírus podem estar associadas a sintomas do sistema nervoso central (por exemplo, meningite e encefalite), febre, artralgia, mialgia, erupção cutânea, febre hemorrágica, cefaleia e conjuntivite. Vários flavivírus também são patogênicos para animais domésticos ou selvagens (como porco, cachorro, cavalo e ovelhas) sendo assim, causam doenças economicamente importantes (Simmonds et al., 2018; Simmonds et al., 2017; Wong; Poon; Wong, 2016).

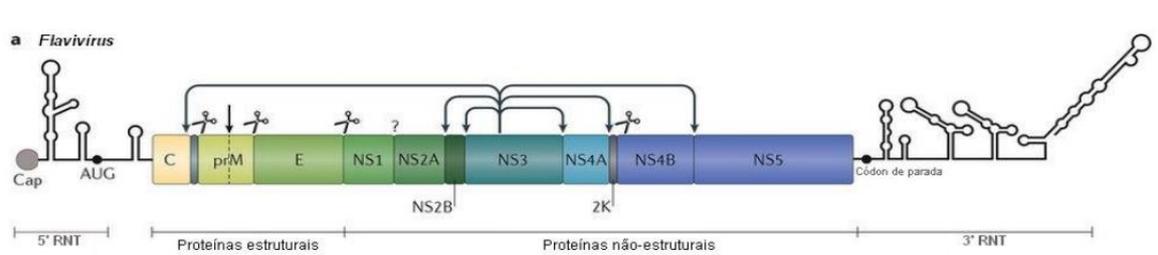
Os membros do gênero *Flavivirus* são partículas pequenas, medindo de 40 a 60 nm de diâmetro, que possuem um capsídeo proteico com simetria icosaédrica, envolvido por um envelope lipídico em que estão inseridas as proteínas de membrana (M) e espículas glicoproteicas (E) (Simmonds et al., 2017) (Figura 3).



**Figura 3: Representação esquemática de uma partícula de *Flavivirus*.** Partícula de *Zika virus*. Fonte: Adaptado de “ViralZone”, Swiss Institute of Bioinformatics ([http://viralzone.expasy.org/6756?outline=all\\_by\\_protein](http://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_protein)).

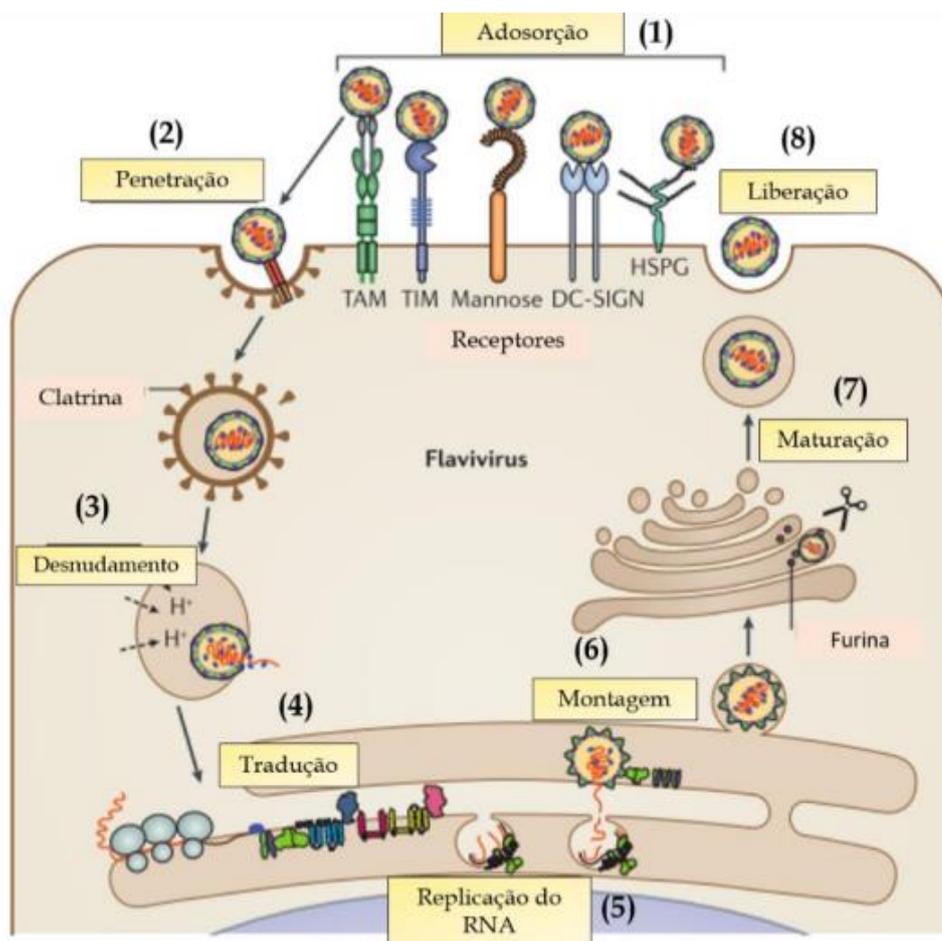
Em relação ao seu genoma, os flavívirus possuem RNA de fita simples de polaridade positiva, não segmentado, medindo aproximadamente 11 kb. Esse genoma possui uma única janela de leitura (ORF - *open reading frame*) que dá origem a uma poliproteína precursora, que é clivada por proteínas virais e proteases do próprio hospedeiro, em aproximadamente 10 a 12 proteínas estruturais e não estruturais (Chen et al., 2017; Simmonds et al., 2018).

O genoma codifica três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, pré-membrana/membrana (prM) e a proteína E e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que exercem funções de regulação do genoma e são essenciais para replicação, virulência e patogenicidade (Santos; Romanos; Wigg, 2008) (Figura 4).



**Figura 4: Genoma dos *Flavivirus*.** Os *Flavivirus* apresentam uma ORF que codifica uma poliproteína que após ser traduzida é clivada em 3 proteínas estruturais (C, prM e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: Adaptado de Neufeldt et al., 2018.

Os flavivírus multiplicam-se no citoplasma e o ciclo inicia-se com a ligação do vírus ao receptor presente na superfície celular. Não se sabe ao certo qual estrutura serve como receptor, no entanto os flavivírus são capazes de infectar diversos tipos celulares (neurônios, macrófagos, monócitos e células dendríticas), dessa forma presume-se que são capazes de interagir com diversas moléculas presentes na superfície celular. Após a adsorção, a partícula penetra na célula por meio de endocitose mediada por clatrina. Dentro do endossoma, ocorre uma acidificação, que deixa o pH baixo e induz uma mudança conformacional no envelope viral que permite a fusão da membrana do vírus com as membranas do endossoma, para, então, liberar o RNA viral no citoplasma (Lindenbach; Thiel; Rice, 2007). No citoplasma, o RNA de polaridade positiva é reconhecido pelos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso, que iniciarão a tradução desse RNA, resultando em uma poliproteína. As proteínas virais e as proteases clivam a poliproteína, dando origem às proteínas estruturais e não estruturais. A síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa é o primeiro passo da replicação do RNA genômico, essa fita servirá de molde para novas fitas de RNA de polaridade positiva, cuja transcrição é realizada pela viral RNA polimerase RNA dependente. Posteriormente, as partículas são montadas e amadurecidas no complexo de Golgi, onde ocorre a clivagem da proteína prM pelo rearranjo das proteínas de superfície. Depois da maturação, as partículas são transportadas até a superfície celular, por meio de vesículas, e liberadas pela fusão das membranas da vesícula e membrana celular (exocitose) (Figura 5) (Lindenbach; Thiel; Rice, 2007; Santos; Romanos; Wigg, 2008; Neufeldt et al., 2018).



**Figura 5: Ciclo de multiplicação dos *Flavivirus*.** (1) Adsorção. (2) Entrada do vírus por endocitose (penetração). (3) Fusão da membrana viral com a membrana endossômica permitindo a liberação do genoma viral no citoplasma (desnudamento). (4) No citoplasma, o RNA viral é reconhecido pelos ribossomos e inicia a tradução das proteínas virais. (5) A replicação do RNA de polaridade positiva ocorre por meio de um RNA intermediário de polaridade negativa, cuja transcrição é feita pela polimerase viral. (6) Montagem das novas partículas virais, nas membranas do retículo endoplasmático rugoso. (7) Maturação dos vírions, no complexo de Golgi. (8) Liberação dos vírions na superfície celular. Fonte: Adaptado de Neufeldt et al., 2018.

### 2.3 - *Zika virus*

Em 1947 um grupo de pesquisadores trabalhava na Floresta de Zika, Uganda, procurando indícios da Febre Amarela, quando descobriram um macaco da espécie *Macaca mulatta* (macaco Rhesus) que apresentava sinais febris. Dessa forma, recolheram o soro desse macaco e isolaram um vírus diferente do esperado, que foi denominado *Zika virus* (Dick et al., 1952), mesmo nome da floresta onde foi isolado.

Posteriormente, em 1948, um ano após seu isolamento, o vírus foi encontrado novamente na região em um mosquito da espécie *Aedes africanus*. O isolado foi chamado de MR-766, a linhagem africana (Dick, 1952 I; Dick et al., 1952 II; Haddow et al., 1964, Weinbren; Williams, 1958).

Em 1954 foi relatada pela primeira vez a infecção do ZIKV em humanos. A infecção foi confirmada em três pacientes nigerianos por meio da amostra de soro, em que realizaram o isolamento do vírus e anticorpos neutralizantes para ZIKV (Macnamara, 1954). Em 1966, foi isolada de um pool de mosquitos *A. aegypti* coletados na Malásia uma linhagem de ZIKV diferente da africana (MR-766), designada P6-740 (linhagem asiática) (Marchette et al., 1969). Apesar de haver uma diferença na sequência de nucleotídeos da proteína NS5 entre o ZIKV MR-766 (linhagem africana) e P6-740 (linhagem asiática), esse apresenta somente um sorotipo (Wong; Poon; Wong, 2016; Kudchodkar et al., 2018).

Até então, os casos de ZIKV em humanos eram esporádicos e restritos a África e a Ásia, no entanto, há indícios que o ZIKV se espalhou para o leste da África equatorial e da Ásia para as ilhas do Pacífico durante o final de 2000 ao início de 2010, e em 2015 invadiu o Caribe e a América Central e do Sul e atingiu a América do Norte em 2016 (Martínez de Salazar et al., 2016; Song et al., 2017).

Em 2007 o ZIKV causou o primeiro grande surto fora da África e da Ásia, o surto ocorreu na Ilha Yap, uma parte dos Estados Federados da Micronésia, como uma doença relativamente leve caracterizada por febre, erupção cutânea, artralgia e conjuntivite (Duffy et al., 2009, Lanciotti et al., 2008). Pelo menos 75% da população da ilha foi infectada (Wong; Poon; Wong, 2016) e 18% dessas pessoas possuíam sinais clínicos que provavelmente estava relacionado à infecção pelo ZIKV (Duffy et al., 2009). Em 2013 na Polinésia Francesa ocorreu outro grande surto de ZIKV, em que aproximadamente 11% da população total tenha procurado tratamento médico por suspeita de infecção pelo vírus (Musso et al., 2014).

No Brasil, só em 2016, houveram 165.932 casos suspeitos de Zika, dos quais 66 mil foram confirmados. Entre 2015 e 2016 também foram confirmados casos de ZIKV na Bolívia, Venezuela, Paraguai, Guiana Francesa e Equador (Martínez de Salazar et al., 2016).

O ZIKV é transmitido principalmente por meio da picada de mosquitos especialmente do gênero *Aedes*, sendo os mais relatados o *Aedes aegypti* e *Aedes*

*albopictus*. Não obstante, a transmissão do vírus pode ocorrer por meio de contato humano como: da mãe para o feto durante a gravidez ou durante o parto (transmissão vertical), contato sexual, transfusão de sangue e amamentação (Foy et al., 2011; Musso et al., 2014; Musso et al., 2015; Martínez de Salazar et al., 2016).

A infecção por ZIKV geralmente é assintomática (80% dos casos) ou se apresenta como uma doença aguda autolimitada denominada Febre Zika. Os principais sintomas são febre, artralgia, mialgia, cefaleia, exantema e conjuntivite. O período de incubação varia de 3 a 7 dias e os sintomas geralmente aparecem na fase virêmica e desaparecem espontaneamente em uma semana aproximadamente, no entanto a artralgia pode persistir por até um mês (Macnamara, 1954; Foy et al., 2011; Martínez de Salazar et al., 2016; Brasil et al., 2016). Como os sintomas são parecidos com os de outras arboviroses, como Dengue, muitas vezes ocorre a subnotificação dos casos, por um diagnóstico incorreto (Rossi et al., 2016).

Embora a infecção pelo ZIKV geralmente não cause sintomas ou apenas uma doença autolimitada leve, como apresentado anteriormente, recentemente foi associada a um número crescente de doenças neurológicas graves, como microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (Rossi et al., 2016).

A síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune rara, que pode ser desencadeada por uma infecção de origem bacteriana ou viral. Nessa síndrome o sistema imunológico ataca parte do sistema nervoso periférico, causando formigamento, fraqueza muscular, paralisia e até mesmo a morte (Sejvar et al., 2011; Hugh; Bart; Pieter, 2016). A associação entre o ZIKV e a síndrome de Guillain-Barré foi observada pela primeira vez durante o surto de 2013 e 2014 relatado na Polinésia Francesa e, posteriormente, durante 2015 e 2016 nas Américas (Song et al., 2017).

A Microcefalia é uma condição neurológica em que o cérebro de uma criança não se desenvolve completamente, fazendo com que a cabeça seja menor do que o esperado (Klase et al., 2016). No Brasil, durante o surto de ZIKV houve um aumento no número de recém-nascidos com microcefalia, o que levou a uma associação entre os casos de ZIKV e microcefalia (Brasil et al., 2016), sendo registrados 8.301 casos de microcefalia de novembro de 2015 a julho de 2016 (Magalhães-Barbosa et al., 2016). Posteriormente, diversos estudos foram publicados demonstrando o risco potencial de microcefalia associado à infecção pelo ZIKV (Brasil et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Johansson et al., 2016).

Além da microcefalia, temos os casos de Síndrome Congênita do Zika (CSZ), em que os indivíduos apresentam uma série de complicações neurológicas como: redução do tecido cerebral, excesso de tônus muscular, irritabilidade, convulsões e lesões oculares (Eickmann et al., 2016).

Para o diagnóstico da infecção por ZIKV podem ser realizados testes moleculares como a RT-PCR (de 3 a 10 depois do aparecimento dos primeiros sintomas) e sorológicos (IGM- até 12 semanas após o aparecimento dos primeiros sintomas) (Lanciotti et al., 2007; Duffy et al., 2009).

Atualmente, não existem vacinas ou terapias antivirais disponíveis contra esse patógeno, o tratamento realizado é somente sintomático, com a utilização de analgésicos, hidratação e repouso do paciente (Luz et al., 2015). Dessa forma, destaca-se a necessidade urgente do desenvolvimento de estratégias de controle eficientes para este patógeno, como vacinas e medicamentos antivirais.

Assim, estudos que busquem entender melhor a biologia e patogênese do ZIKV são de extrema importância, pois podem contribuir para o desenvolvimento de antivirais específicos. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa vem estudando alguns fatores relacionados ao hospedeiro que possam contribuir para a patogênese do ZIKV, bem como faz a prospecção de substâncias naturais com potencial ação antiviral. Recentemente, demonstramos que a infecção *in vitro* e *in vivo* pelo ZIKV leva a um aumento na produção de ERO, causa uma diminuição do sistema de defesa antioxidante, culminado com o estresse oxidativo (Almeida et al., 2020). Ainda, demonstramos *in vitro* que a Silimarina apresenta uma significativa atividade antiviral contra o ZIKV (Santos et al., 2020).

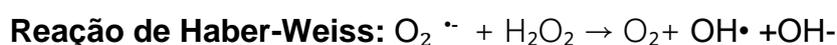
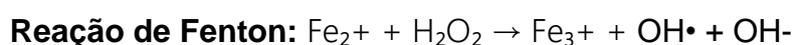
#### 2.4 - Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Estresse Oxidativo

As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) incluem uma série de moléculas quimicamente reativas derivadas do oxigênio, podendo ser divididas em dois grupos: os radicais livres e as moléculas não radicalares (Gracy et al., 1999; Çanakçı; Çanakçı, 2005). Os radicais livres são um grupo de átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, dessa forma são instáveis e muito reativos, sendo capazes de se ligar a diversas estruturas celulares e causar danos (Halliwell; Gutteridge, 2000). Já as espécies não radicalares não possuem

elétrons desemparelhados, mas são da mesma forma que os radicais livres, altamente reativas.

As ERO são geradas por diversas fontes e produzidas por todas as células de mamíferos (Halliwell; Gutteridge, 1984). São produzidas como resultado da atividade de enzimas como NADPH oxidase (NOX), ciclo-oxigenase, xantina oxidase, lipoxigenases, dentre outras (Pillai et al., 2019).

Os radicais livres de oxigênio mais comuns são o hidroxila (OH•) e o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O O<sub>2</sub><sup>-</sup> é o principal produto formado a partir da redução do oxigênio com um elétron (Halliwell; Gutteridge, 1999). Em condições biológicas ele é produzido normalmente pelas mitocôndrias e peroxissomas, ocorrendo em praticamente todas as células aeróbicas. Sua produção ocorre ativamente perante a ativação de macrófagos, neutrófilos e monócitos (Comhair; Erzurum, 2002; Ferreira; Matsubara, 1997; Silva; Gonçalves, 2010). O radical hidroxila (OH•) é o mais reativo e assim o mais danoso presente nos sistemas biológicos. Logo após sua formação, causa danos nas regiões próximas de onde foi sintetizado, já que possui uma meia vida muito curta. Pode levar a danos no DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (Garcez et al., 2004; Andrade Junior et al., 2005; Valko et al., 2007). A geração do hidroxil pode ocorrer por meio de duas equações, como mostrado abaixo (Andrade Junior et al., 2005):



Já em relação as espécies não radicalares, uma das mais relevantes em relação aos sistemas biológicos é o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>) (Çanakçi; Çanakçi, 2005). Apesar de não possuir elétrons desemparelhados, ele é altamente reativo, uma vez que participa das reações para a formação de hidroxila, como visto anteriormente, e uma meia vida longa que o permite reagir com diversas moléculas como lipídios, hemoproteínas, e realizar alterações nos cromossomos e DNA (Olszewer, 1995; Garcez et al., 2004). A redução de dois elétrons de oxigênio ou a dismutação do ânion superóxido determina a formação do peróxido de hidrogênio,

sendo formado principalmente pelas mitocôndrias durante o processo de respiração celular (Silva; Gonçalves, 2010; Garcez et al., 2004).

As ERO são essenciais para a execução de importantes funções vitais como a resposta imune a infecções bacterianas e virais, a regulação de citocinas e a sinalização celular (Valko et al., 2007). No entanto, em excesso, podem causar diversos danos teciduais e danificar ácidos nucleicos, organelas celulares, lipídeos e proteínas (Shackelford; Kaufmann; Paules, 2000; Gracy et al., 1999). Essas espécies estão também relacionadas ao envelhecimento, apoptose, necrose e a patogênese de diversas doenças infecciosas e não infecciosas (Zhang et al. 1997; Griffiths; Halestrap, 1995; Halliwell; Cross, 1994).

Para evitar suas ações maléficas quando em excesso, nos sistemas biológicos a contenção das ERO é realizada por meio dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição, redução ou atraso das lesões causadas pelos radicais livres e moléculas reativas nas células e tecidos (Bianchi; Gregg, 1999).

Os antioxidantes enzimáticos são produzidos por organismos eucariotos, sendo assim endógenos. Os principais antioxidantes enzimáticos são a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e a Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas reagem com as ERO, as contendo ou neutralizando, protegendo as células e os tecidos do estresse oxidativo (Traber, 1997).

A Superóxido Dismutase (SOD) é responsável pela conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio. Possui três isoformas, a depender de seu local de ação. A SOD1 (Cu/ZnSOD) realiza a dismutação do ânion superóxido no citoplasma, enquanto a SOD2 (MnSOD) atua na região mitocondrial e a SOD3 (EC Cu/ZnSOD) no espaço extracelular. É a mais importante enzima do sistema antioxidante enzimático, já que são as primeiras a iniciar o processo antioxidante (Rahman et al., 2006) (Figura 6).



**Figura 6: Reação catalisada pela enzima SOD.** A SOD converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio.

Outro antioxidante enzimático é a Catalase (CAT), que realiza a conversão de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular (Figura 7). O peróxido de hidrogênio origina-se da inativação do ânion superóxido pela Superóxido Dismutase. A CAT é uma enzima presente na maioria dos peroxissomas e mitocôndrias dos mamíferos, exceto nos eritrócitos, onde é encontrada no citosol (Ferro et al., 2010). A CAT age de maneira complementar ao sistema antioxidante da glutathiona, sendo mais eficaz que esse em altas concentrações de peróxido de hidrogênio (Silva; Gonçalves, 2010).



**Figura 7: Reação catalisada pela enzima CAT.** A CAT detoxifica o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Os antioxidantes não enzimáticos são aqueles que podem ser consumidos durante o processo de alimentação (Waters *et al.*, 1996), como as vitaminas (A, C e E), flavonóides e minerais (Amara-Mokrane *et al.*, 1996; Traber; Packer, 1995; Decker, 1997; Alfieri *et al.*, 1998). Esses antioxidantes são capazes de conter e/ou impedir as lesões induzidas pelos radicais livres (Pool-Zobel *et al.*, 1997).

Quando ocorre uma produção exacerbada de ERO, concomitante a uma ineficiência das defesas antioxidantes, isso leva a danos a diferentes constituintes celulares, num processo chamado de “Estresse Oxidativo”. Então, o Estresse Oxidativo pode ser definido como uma ruptura/desregulação da sinalização e controle redox, ou seja, toda vez em que se tem uma perturbação na homeostase entre espécies oxidantes e antioxidantes (Jones, 2006). O aumento na produção de ERO assim como a regulação positiva ou negativa das enzimas antioxidantes representam uma disfunção no *status* oxidativo celular (Costantini, 2019). Essas alterações do *status redox* podem ser benéficas ou maléficas às células e tecidos, uma vez que podem fazer parte de funções vitais e também causar danos, como já discutido anteriormente.

## 2.5 - Estresse oxidativo e infecções virais

A formação de ERO nem sempre é deletéria durante um processo infeccioso, uma vez que são produzidas pelas células com o intuito de conter o agente invasor, sendo assim um mecanismo de defesa. No entanto, esse processo possui baixa especificidade, pois da mesma forma que tenta combater a infecção, acaba gerando danos às células do próprio organismo. Assim, com o progresso da infecção, ocorre a formação de mais ERO, que pode levar ao estresse oxidativo (Roos et al., 2013).

O estresse oxidativo pode estar associado à patogênese de diversas infecções virais, principalmente devido a modulação positiva de ERO durante a resposta imune do hospedeiro. Os macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas recrutados pela infecção viral podem estar relacionados ao estresse oxidativo, uma vez que podem induzir ERO e citocinas pró-oxidantes como IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF) (Goelbock et al., 1991).

Além disso, alguns vírus são capazes de afetar a relação oxidante/ antioxidante do hospedeiro por uma desregulação das enzimas antioxidantes. Estudos presentes na literatura indicam que a inibição das enzimas antioxidantes durante a infecção por alguns vírus pode estar relacionada a inibição da via do fator de transcrição (eritróide-2)- fator 2 (Nrf2). O fator Nrf2 é responsável pela ativação dos genes das enzimas antioxidantes, sendo assim sua inibição por agentes virais pode estar relacionada ao desequilíbrio redox e pode afetar a patogênese viral. Por outro lado, em outras infecções virais, a indução de ERO pode ativar a via de Nrf2, aumentando as enzimas antioxidantes presentes nas células, o que não necessariamente pode ser suficiente para neutralizar o excesso de ERO e evitar o estresse oxidativo (Ramezani et al., 2018).

As ERO mais comuns durante uma infecção viral são o ânion superóxido, o radical hidroxil e seus subprodutos, e o peróxido de hidrogênio. Essas espécies reativas estão envolvidas com a regulação de respostas celulares e a resposta imune do hospedeiro a infecções, dessa forma, uma alteração na produção dessas espécies, assim como alterações nos antioxidantes envolvidos, podem levar a uma desregulação na expressão gênica e do ciclo celular, podendo ser maléfica ao organismo. No entanto, essas desregulações podem favorecer o vírus e sua

multiplicação, fazendo parte de sua patogênese (Choi; Ou, 2006; Ha et al., 2010; Zhang et al., 2014; Camini et al., 2017)

O primeiro estudo que evidenciava a relação entre estresse oxidativo e infecções virais foi realizado por Peterhans em 1979, depois disso diversos outros estudos mostraram a relação entre o estresse oxidativo e a patogênese de infecções virais (Peterhans, 1979; Camini et al., 2017).

O estresse oxidativo ocorre na infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) induzindo danos hepáticos por meio do aumento de ERO, diminuição de glutathiona, aumento do biomarcador de estresse Malondialdeído (MDA), além de uma diminuição nas concentrações citoplasmáticas e hepáticas de zinco, que está envolvido no mecanismo de reparo do DNA (Paula; Bernasconi; Carvalho, 2017). O aumento das ERO está envolvido com os casos de carcinoma hepatocelular, um tumor cancerígeno, no fígado de paciente com Hepatite C e B (HBV) (Abel et al., 2019).

Na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ocorrem alterações nas enzimas antioxidantes, principalmente nas Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathiona Peroxidase, e também o aumento de MDA, verificando-se assim um estado de estresse oxidativo, que pode contribuir para avanço da doença (Dröge et al., 1994; Coaccioli et al., 2010).

Estudos indicam também a relação entre estresse oxidativo e arboviroses, como o caso da Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV), Caraparu (CARV) e Zika (ZIKV) (Gil et al., 2004; Dhanwani et al., 2011; Joubert et al., 2012; Camini et al., 2017; Caetano et al., 2019; Almeida et al., 2020). Na infecção por DENV já foi demonstrado uma alteração nos padrões dos marcadores de danos oxidativos, durante a fase febril e convalescente da infecção, que está relacionado à patogênese e progressão da doença. Além disso, o aumento de ERO na infecção pode estar relacionada a sintomas graves, como a Síndrome de Choque da Dengue, uma vez que as ERO acarretam um aumento de citocinas, que pode levar ao extravasamento de plasma (Gil et al., 2004; Klassen et al., 2004; Seet et al., 2009; Pillai et al., 2019). Já em relação ao CHIKV foi observado o aumento de ERO em fibroblastos (Joubert et al., 2012) e uma diminuição da enzima antioxidante CAT em camundongos neonatos infectados (Dhanwani et al., 2011). Em células de neuroblastoma infectadas por CHIKV foi observado o aumento dos níveis de MDA (Dhanwani et al., 2011).

Em 2014 nosso grupo de pesquisa avaliou se a infecção por CARV poderia induzir estresse oxidativo no fígado de camundongos infectados. A infecção por CARV alterou a expressão das enzimas SOD e CAT e aumentou os níveis de Glutathiona, no entanto, não alterou os biomarcadores de estresse oxidativo (Camini et al., 2014). Em outro estudo realizado pelo grupo, verificou-se que infecção por CARV aumentou os níveis de ERO, mas aparentemente não resultou em danos oxidativos (Almeida, 2016).

Nosso grupo de estudos também demonstrou que o estresse oxidativo ocorre na infecção pelo MAYV tanto *in vitro* como *in vivo*. Foi verificado o aumento de ERO e dos biomarcadores de estresse oxidativo e um quadro de inflamação hepática em modelo celular e murino (Camini et al., 2017; Caetano et al., 2019).

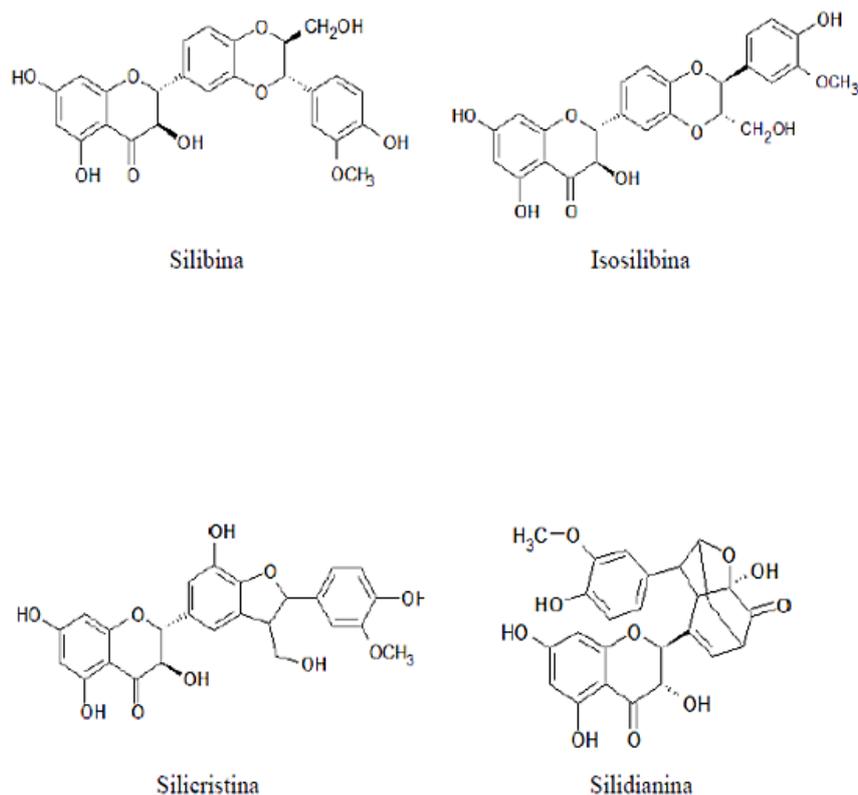
Por fim, também demonstramos que o estresse oxidativo ocorre na infecção pelo ZIKV, tanto *in vitro* como *in vivo*. Após infecção de células humanas de linhagem neuronal U-87 com o ZIKV, ocorre um desequilíbrio no *status* oxidante/antioxidante, com o aumento das ERO e dos biomarcadores de estresse oxidativo. Também em um modelo animal de infecção pelo ZIKV, observou-se o aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo e diminuição das defesas antioxidantes no fígado e cérebro dos animais infectados (Almeida et al., 2020).

Como mostrado anteriormente, diversos estudos mostram a relação entre o estresse oxidativo e a patogênese de agentes virais, dessa forma, a avaliação do efeito de compostos antioxidantes durante as infecções por vírus é justificável, uma vez que esses podem inibir a formação de ERO, o estresse oxidativo e consequentemente podem diminuir a patogênese viral.

## 2.6 - Silimarina

A Silimarina é um conjunto de substâncias extraída da planta *Silybum marianum* (*Asteraceae*), popularmente conhecida como “Cardo de leite”. É nativa das regiões do sul da Europa, norte da África, sul da Rússia e Ásia Menor; no entanto também se adaptou a regiões da América do Norte e do Sul e ao sul da Austrália (Capasso et al., 2003; Lino, 2012). O extrato de todo conteúdo vegetal da *Silybum marianum* contém uma mistura de sete flavonolignanos: Silibina A, Silibina B, Isossilibina A, Isossibilina

B, Silicristina, Isosilicristina e Silidianina; além do flavonóide Taxifolina. A proporção de flavonolignanos e flavonóides corresponde a aproximadamente de 70 a 80% do extrato da planta, sendo os ativos em maior concentração a Silibina A e B (Figura 8). O restante do extrato contém ácidos graxos e polifenóis (Ding et al., 2001; Kroll; Shaw; Oberlies, 2007; Mastron et al., 2015; Bijak, 2017).



**Figura 8: Estrutura da Silimarina.** Fonte: Sonnenbichler e colaboradores (1999) adaptado.

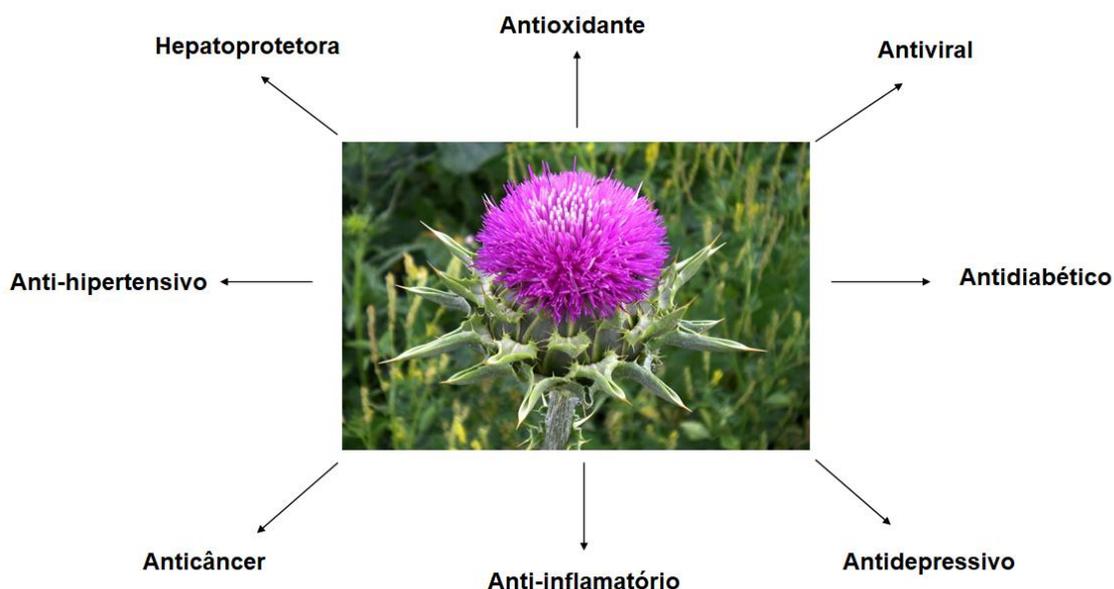
A Silimarina era descrita há séculos como um fitoterápico hepatoprotetor, empregado no tratamento de doenças hepáticas como hepatites crônicas, carcinoma hepatocelular, cirrose e icterícia (Camini; Costa, 2020; Mastron et al., 2015; Karimi et al., 2011; Rambaldi et al., 2005). Entretanto, atualmente diversos estudos têm demonstrado o tratamento de várias patologias com o uso de Silimarina. Acredita-se que o aumento dos estudos relacionados a Silimarina deve-se ao fato de suas

propriedades antioxidante e anti-inflamatória, assim como seu papel modulatório nas vias de sinalização celular (Camini; Costa, 2020)

Dessa forma, já foram apresentados estudos promissores da Silimarina no tratamento de doenças como diabetes mellitus (Fallahzadeh et al., 2012; Koujan et al., 2018; Tuorkey; El; Kamel, 2015; Amniattalab et al., 2016), hipertensão e outras doenças cardiovasculares (Vasanthi; ShriShriMal; Das, 2012; Taleb et al., 2018); doenças neurodegenerativas e proteção do sistema nervoso (Kittur et al., 2002; Chtourou et al., 2010; Pandima et al., 2017; El-Marasy; Abd-Elsalam; Ahmed-farid, 2018; Ullah H; Khan H, 2018), uma grande variedade de cânceres (Deep; Agarwal, 2007; Tyagi et al., 2007; Ramasamy; Agarwal, 2008; Féher; Lengye, 2012; Khorsandi et al., 2017; Won et al., 2018), depressão (Thakare; Aswar; Kylkarni, 2017; Thakare et al., 2018), doenças parasitárias (Faridnia et al., 2018; Mata-Santos et al., 2010; El-Sayed et al., 2016) e atividade antiviral contra HCV (Wagoner et al., 2010; Polyak; Ferenci; Pawlotsky, 2013; Liu et al., 2016), HBV (Huang et al., 2017), Enterovírus-71 (Lalani et al., 2020), HIV-1 (Mcclure et al., 2012), Influenza A (Song; Choi, 2011) e as arboviroses CHIKV (Lani et al., 2015), MAYV e ZIKV (por nosso grupo de pesquisa) (Camini et al., 2018; Silva et al., 2020; Ferraz et al., 2021) (Figura 9).

A Silimarina destaca-se sobretudo por sua potente ação antioxidante, chegando a ser aproximadamente 10 vezes maior do que a ação da vitamina E (Ross, 2008). As hidroxilas dos compostos da Silimarina eliminam os radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio, diminuindo assim a oxidação das células e tecidos. A Silimarina também é capaz de aumentar os níveis dos antioxidantes enzimáticos como SOD, CAT e glutathione, reduzindo assim os danos oxidativos celulares (Turgut et al., 2008; Zaidi; Mahboob, 2017; Taleb et al., 2018; Di et al., 2013).

A Silimarina atualmente é vendida como um fitoterápico podendo ser empregada como um tratamento auxiliar a diversas doenças e está disponível nas farmácias. O consumo de Silimarina em humanos varia de 240 a 900 mg/dia, sendo a dose dividida em duas ou três vezes ao dia com um intervalo de tempo reduzido, já que possui um tempo de meia vida curto, de 4 a 6 horas (Luper, 1998; Frascini; Demartini; Esposti, 2002; Karimi et al., 2011).



**Figura 9: Silimarina e suas várias ações.** Fonte: Adaptado - Camini; Costa, 2020.

## 2.7 - N - acetilcisteína (NAC)

A N-acetilcisteína (NAC), ou L- $\alpha$ -acetamido- $\beta$ -ácido-mercaptopropiônico, foi introduzida no mercado pela indústria farmacêutica durante os anos de 1960, sendo o primeiro agente mucolítico comercializado para o tratamento de doenças respiratórias (Lara; Oliveira Filho, 1999).

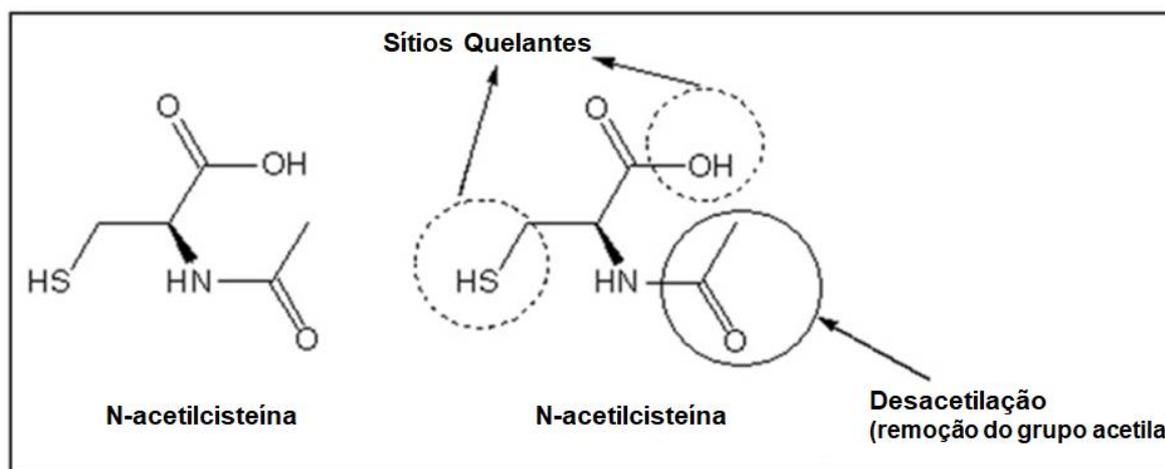
A NAC, além de agente mucolítico, é um conhecido antioxidante descrito na literatura (Vignal et al., 2017). Estudos indicam que a NAC está envolvida com a síntese de Glutathione, aumentando sua concentração em condições de estresse oxidativo, protegendo assim as células e tecidos dos processos oxidativos (Zunec et al., 2014; Bayir et al., 2013; Shadhia et al., 2011) (Figura 10).

A NAC já demonstrou atividade antioxidante na infecção pelo *Rift Valley Fever virus* (RVFV) (Narayana et al., 2011) e também demonstrou um bom resultado no tratamento de hepatite grave associada à Dengue, além de possuir atividade antiviral contra esse vírus (Habaragamuwa; Dissanayaka, 2014; Sreekanth et al., 2019). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram o potencial antiviral da NAC contra os vírus Influenza A (H5N1 e H3N2), em que o tratamento aumenta os níveis de glutathione,

reduz a carga viral e inibe a replicação do vírus (Ghezzi; Ungheri, 2004; Geiler et al., 2010).

A NAC possui atividade hepatoprotetora, protegendo o fígado de inflamações e intoxicação por drogas (Zwingmann; Bilodeau, 2006; Sklar; Subramaniam, 2004), sendo o antídoto mais amplamente administrado na intoxicação por paracetamol (Kelly, 1998; Lee, 2004). Além disso, pode auxiliar na desintoxicação por metais pesados, como chumbo e mercúrio (Kasperczyk et al., 2013; Oliveira et al., 2015) e no envenenamento por pesticidas (El-Ebiary et al., 2016; Tehrani et al., 2013).

A NAC também preveniu danos nos corações de camundongos diabéticos e de ratos com insuficiência cardíaca crônica, uma vez que auxiliou na prevenção dos danos oxidativos causados pelas doenças cardíacas (Liu et al., 2015; Barreiro et al., 2016).

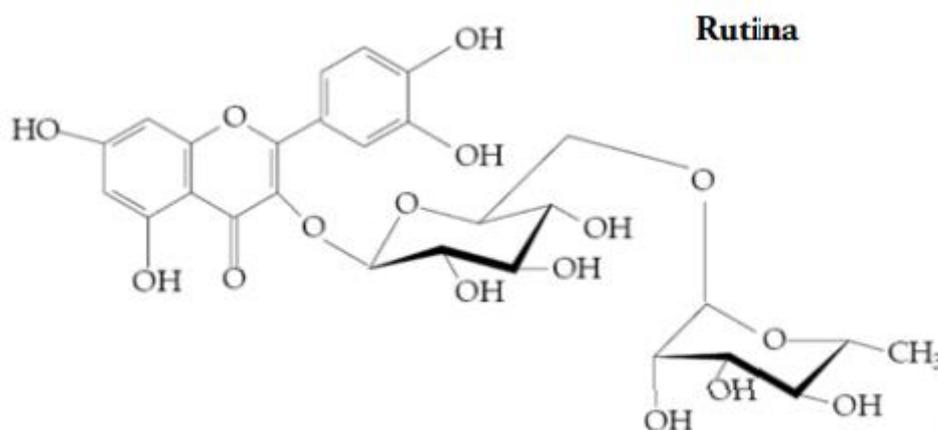


**Figura 10: Estrutura da N-acetilcisteína (NAC).** Apresentando dois sítios quelantes (tiol e hidroxila) e uma desacetilação responsável por seu potencial antioxidante devido à geração de glutatona. Fonte: Adaptado - Swaran, 2009.

## 2.8 - Rutina

A Rutina ou Vitamina P (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona-3-ramnoglicosídeo) é um flavonoide heterosídeo (glicosídeo) (Harborne, 1986), que pode ser chamada também de quecetina-3-rutinosídeo, rutosídeo e soforina (Kreft et al., 1997). É

encontrada em diversos alimentos como vinho tinto, chá preto, uva, trigo-sarraceno, maçã, cebola, feijão vermelho, tomate e maracujá (Hollman et al., 1996; Harborne, 1986). Entre os flavonoides, a Rutina é um dos que mais se destacam em relação a suas propriedades farmacológicas (Pedriali, 2005) (Figura 11).



**Figura 11: Estrutura da Rutina.** Fonte: Pedriali, 2005.

Por sua atividade antioxidante, auxilia o tratamento de doenças que envolvem radicais livres, não sendo tóxica ao organismo durante a terapia (Afanas et al., 1989). Além disso, possui atividade vasoprotetora e cardioprotetora, melhorando a insuficiência de vasos venosos e linfáticos, que podem ocorrer em pacientes com hipertensão e doenças hemorrágicas, favorecendo o aumento da resistência e a regularização da permeabilidade da parede desses vasos (Pathak; Pathak; Singla, 1991). A Rutina evita os danos oxidativos, causado pelo estresse oxidativo na hipertensão, nas células endoteliais da aorta, apresentando assim um efeito anti-hipertensivo (Kim et al., 2009).

A Rutina também já demonstrou uma atividade anti-hipercolesterolêmica, antidiabética (Srinivasan et al., 2005; Kanashiro et al., 2009; da Silva et al., 2001) e hepatoprotetora, diminuindo os níveis das transaminases hepáticas (ALT e AST) no fígado, soro e coração de ratos (Fernandes et al., 2010).

As ERO têm sido associadas à patogênese de certos tipos de cânceres (Ganeshpurkar; Saluja, 2017), e a Rutina tem sido muito estudada em relação aos possíveis efeitos antineoplásicos e anticancerígenos, por sua ação antioxidante. Em

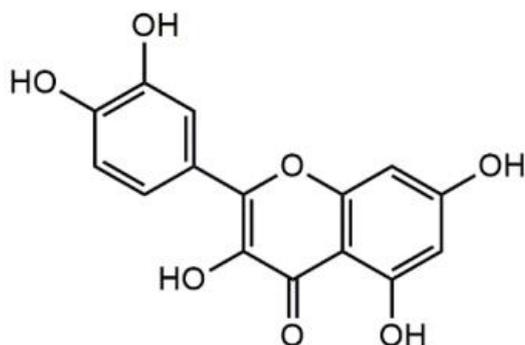
um estudo, a Rutina demonstrou uma redução significativa no tamanho do tumor em camundongos que apresentavam uma linhagem de células de leucemia humana implantadas (HL-60) (Lin et al., 2012). Esse flavonoide também demonstrou um efeito anti-neuroblastoma, inibindo consideravelmente o crescimento de células LAN-5 (células de neuroblastoma humano) (Chen et al., 2013). A Rutina também parece ser útil como um auxiliar na radioiodoterapia (Gonçalves et al., 2013).

Estudos indicam que a Rutina também é neuroprotetora, atuando na prevenção de neuroinflamação (Khan et al., 2009; Tongjaroenbuangam et al., 2011); promove a sobrevivência das células da crista neural (Nones et al., 2012); atua como anticonvulsivante (Nieoczym et al., 2014); possui atividade anti-Alzheimer (Javed et al., 2012; Tongjaroenbuangam et al., 2011) e efeito como antidepressivo (Machado et al., 2008).

Ainda, a Rutina vem sendo muito estudada como um antimicrobiano, atuando contra as bactérias *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* e *Klebsiella* sp. (Bernard et al., 1997; Pimentel et al., 2013) e também contra o fungo *Cândida albicans* (Han, 2009). O flavonoide também demonstrou efeito antiviral contra a cepa da gripe aviária H5N1 (Ibrahim et al., 2013) e um análogo da Rutina, o sulfato de Rutina de sódio, pode ser um novo candidato para o desenvolvimento de um agente anti-HIV-1 / HSV (Tao et al., 2007). A Rutina pode inibir o vírus da Dengue, um membro da família *Flaviviridae* (a mesma família do ZIKV) (Zandi et al. 2011) e ainda, em concentração de 100µM inibi em mais de 40% as atividades da protease NS2B-NS3 do ZIKV (Lim et al., 2016).

## 2.9 - Quercetina

A Quercetina (3,5,7-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4Hchromen-4-one) é um pigmento encontrado em diversas plantas que pertence à classe dos flavonoides (Figura 12). Pode ser encontrada em alimentos como a cebola, tomate, alcaparra, alface, brócolis, chá verde e chá preto (Hertog et al., 1993; Nijveldt et al., 2001; Manach et al., 2005; Bischoff, 2008). Pode ser denominada aglicona ou forma sem açúcar da Rutina (aglicona da Rutina) (Baghel et al., 2012).



**Figura 12: Estrutura da Quercetina.** Fonte: Maalik et al., 2014.

A Quercetina possui ação antioxidante, assim como a Rutina, eliminando os radicais livres (Boots; Haenen; Bast, 2008). Estudos *in vitro* demonstram que ela foi capaz de reduzir o risco de formação de catarata por meio de diversas vias, sendo uma delas a diminuição do estresse oxidativo (Stefek; Karasu, 2011). Em outro estudo, a Quercetina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo causado por diabetes mellitus induzida em ratos (Maciel et al., 2013). A atividade antioxidante desse flavonoide também foi testada contra a peroxidação lipídica induzida por terc-butilhidroperóxido em espermatozoides humanos (Moretti et al., 2012).

A Quercetina ainda apresenta atividade neuroprotetora, em que estudos relatam efeitos benéficos contra doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (Choi et al., 2012) e diminuição do estresse oxidativo em células neurais de ratos (Haleagrahara; Siew; Ponnusamy, 2013).

Foi relatado que a Quercetina pode auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares devido ao seu papel anti-inflamatório (Geraets et al., 2007; Russo et al., 2012). Dessa forma, ela suprimiu o desenvolvimento de aneurismas da aorta abdominal em camundongos (Wang et al., 2012) e foi o flavonoide que mais auxiliou na redução da mortalidade por doenças cardiovasculares na Finlândia (contribuindo com 95% do total de 22% de redução da taxa de mortalidade) (Knekt et al., 1998). Assim, uma alimentação rica em Quercetina está associada a baixa incidência de doenças cardiovasculares (Knekt et al., 2000).

Como a Quercetina é um antioxidante, sendo assim capaz de eliminar radicais livres, ela pode auxiliar na prevenção de cânceres que possam ser induzidos por

estresse oxidativo (Baghel et al., 2012). Em uma baixa dose inibiu a proliferação de células de mama cancerosas (humanas), resultando na parada do ciclo celular na fase G1 (Jeong et al., 2009). Outro estudo demonstra que a Quercetina previne o câncer por meio da indução de apoptose e modulação da sinalização de PKC (proteína quinase C), com a redução de estresse oxidativo em células de camundongos com linfoma (Maurya; Vinayak, 2015).

Além disso, possui atividade antiviral contra o vírus da Dengue (Zandi et al. 2011), hepatite C (Bachmetov et al., 2011), influenza A (H1N1) (Uchide; Toyoda, 2011; Fan et al., 2011) Chikungunya, Mayaro, Ebola, Epstein-Barr, hepatite B e vírus da diarreia suína (Chaabi, 2020; Santos et al., 2014; Rojas et al., 2016; Qiu et al., 2016; Cheng et al., 2015; Song; Shim; Choi, 2011).

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1 - Geral

Avaliar a atividade antioxidante e antiviral da Silimarina e N-acetilcisteína em camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV e o papel das ERO na multiplicação viral.

#### 3.2 - Específicos

3.2.1- Em camundongos C57BL/6 controles, infectados com ZIKV, infectados e tratados com Silimarina ou NAC, avaliar:

3.2.1.1. Sobrevida e sinais clínicos de doença;

3.2.1.2. No fígado dos animais:

i. Dosar os biomarcadores de estresse oxidativo - Malondialdeído e Proteína Carbonilada;

ii. Medir a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT;

iii. Quantificar as partículas de vírus.

3.2.2 - Em células Vero infectadas com ZIKV e tratadas com Silimarina, N-acetilcisteína, Quercetina e Rutina:

3.2.2.1. Medir a produção das ERO;

3.2.2.2. Avaliar a atividade antiviral.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Vírus e Células

A amostra do ZIKV (ZIKA/H.sapiens/Brazil/PE-243/215/GenBank:KX197192.1) foi gentilmente cedida pela professora Erna Greessien Kroon, do Laboratório de Vírus, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O vírus foi isolado de um morador do estado de Pernambuco, Brasil, que apresentou Febre Zika sem complicações. A amostra foi armazenada em freezer -80°C (Acesso SisGen AF85085), no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM), localizado no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

As células utilizadas para a realização deste trabalho foram células Vero (derivadas de rim de macaco verde africano) e células C6/36 (derivadas de *Aedes albopictus*). As células C6/36 foram empregadas na produção do estoque de vírus e as células Vero nos ensaios de titulação viral, produção de ERO e antiviral. As células foram gentilmente cedidas pela professora Erna Greessien Kroon, do Laboratório de Vírus, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As células Vero foram mantidas em Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco High Glucose (DMEM, Cultilab, Brasil) e as células C6/36 em meio L-15-Leibovitz (Cultilab, Brasil). Os meios foram suplementados com estreptomicina/penicilina (200U/mL, Sigma-Aldrich, EUA), fungizona (2,5µg/mL Sigma-Aldrich, EUA) e 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, Brasil). As células Vero foram acondicionadas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e as células C6/36 em estufa tipo BOD, a 28°C. A realização dos repiques foi feita quando a monocamada celular atingia cerca de 90 a 100% de confluência.

### 4.2 - Multiplicação e Titulação do vírus

Os estoques virais foram produzidos por meio da multiplicação do ZIKV em células C6/36. As células foram infectadas com a amostra do vírus e após a infecção, foi realizada a adsorção por 1 hora em estufa do tipo BOD, a 28°C, com homogeneização

constante. Posteriormente, foram adicionados 15 mL de meio L-15- Leibovitz com 5% de SFB. A garrafa foi incubada por um período de 7 dias. O sobrenadante da infecção celular foi obtido, clarificado após centrifugação a 5000 rpm a 4°C por 10min (centrífuga moldeo 5804 R, Eppendorf, Brasil) e em seguida aliquoteado em microtubos e armazenado em freezer -80°C.

Para a titulação viral foram utilizadas células Vero. As células foram implantadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e quando atingiram a confluência de 90% foram infectadas com 300µL de diluições seriadas de ZIKV, tendo um poço como controle negativo no qual foi adicionado 300µL de meio DMEM 0% de SFB. Foi realizada a adsorção por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> com homogeneização constante. Após 1 hora de adsorção o meio foi removido e em cada poço foram adicionados 2 mL de DMEM 1% de SFB acrescido de carboximetilcelulose (CMC) a 0,8%. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 3 dias, as células foram fixadas em formol a 10% por 1 hora. As células foram lavadas e coradas com solução de cristal violeta por 5 minutos. O título foi expresso em Unidades Formadoras de Placa (UFP), onde essas foram contadas em poços que continham entre 30 a 300 placas. O número encontrado foi multiplicado pelo inverso da diluição e convertido para mL. O título encontrado foi de  $1 \times 10^{10}$  UFP/mL.

#### 4.3 - Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto, e o protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP), sob o número 4154170919 (Anexo I). Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6 selvagens com 3 semanas de idade (21 dias em média). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com sistema de microisolador, em ambiente com controle de temperatura, luminosidade, ventilação e umidade, não havendo nenhum tipo de restrição em relação à dieta e ao consumo de água.

#### 4.4 - Compostos utilizados *in vivo*

##### 4.4.1 - Silimarina

A silimarina foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich (EUA) e diluída em solução de CMC 0,5% (v/v) para que os animais fossem tratados via gavagem. Os animais foram tratados com 200mg/kg/dia de Silimarina, sendo a dose dividida de 12 em 12 horas. A dose de Silimarina foi baseada em estudos anteriores realizados por nosso grupo de estudos (Ferraz et al., 2021).

##### 4.4.2 - N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) foi obtida comercialmente da EMS (Brasil) na concentração de 40mg/mL, em forma de xarope pronta para o uso. Os animais foram tratados com 300mg/kg/dia de NAC, via gavagem, sendo a dose dividida de 12 em 12 horas. A dose de NAC foi baseada na literatura (Sreekanth et al., 2019).

#### 4.5 - Infecção experimental de camundongos C57BL/6

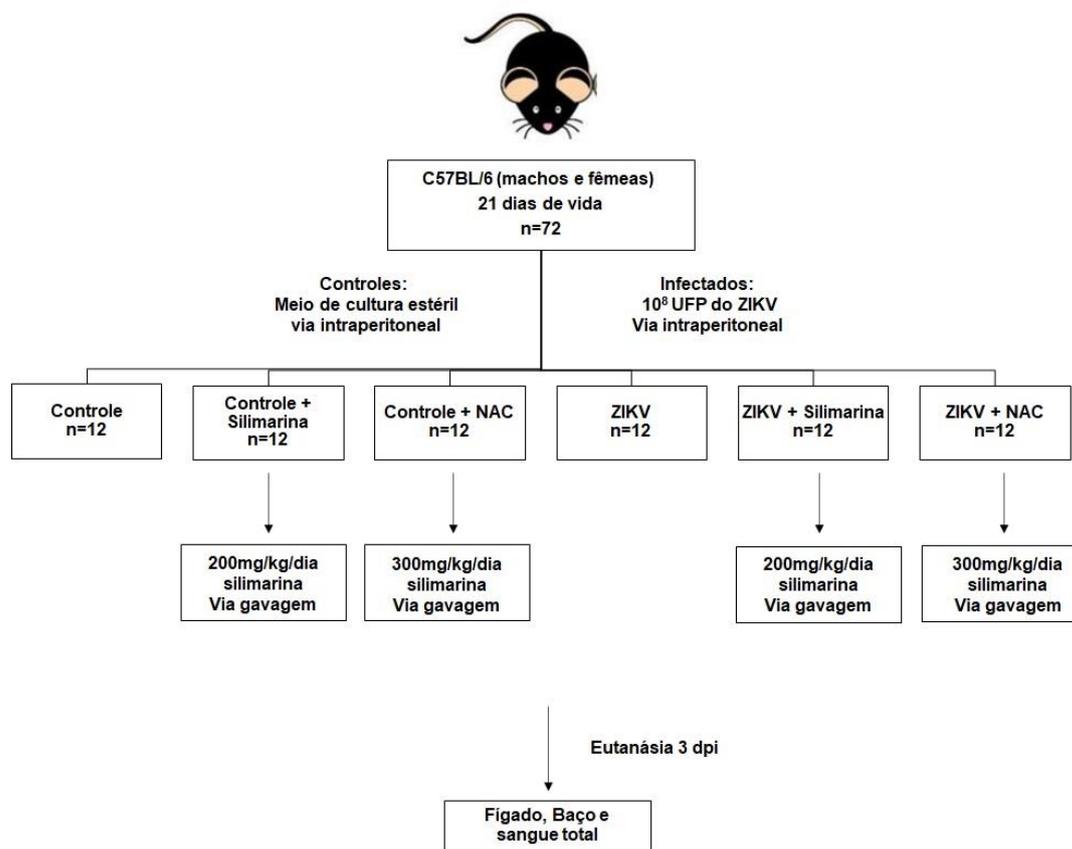
Os experimentos realizados com os camundongos C57BL/6 obedeceram a todas as normas recomendadas pelo comitê de ética em experimentação animal. O cálculo amostral foi realizado por meio do programa BioEstat 5.3.

Primeiramente, um experimento piloto foi feito com um grupo de 8 animais infectados e um grupo de 4 animais controles. O grupo infectado recebeu via intraperitoneal 100µL de meio contendo  $10^8$  UFP do ZIKV; os animais do grupo controle receberam 100µL de meio de cultura também via intraperitoneal. Os camundongos foram acompanhados por 20 dias para observar mortalidade e sinais clínicos da infecção, sendo pesados diariamente em balança semi-analítica, com duas casas decimais (Marte Científica AD3300). A porcentagem de ganho de massa corporal foi determinada considerando a massa inicial 100% e a massa final calculada a partir desse dado.

Em seguida, foi feito outro experimento com 72 animais divididos em 6 grupos (12 animais/grupo), como representado na Figura 13, sendo eles: grupo controle (C); grupo controle tratado com Silimarina (CSIL); grupo infectado com ZIKV (V); grupo infectado com ZIKV e tratado com Silimarina (VSIL); grupo controle tratado com NAC (CNAC); grupo infectado com ZIKV e tratado com NAC (VNAC).

Os animais dos grupos controles (C, CSIL e CNAC) receberam 100µL de meio de cultura simulando a infecção viral, via intraperitoneal (ip). Os animais dos grupos infectados (V, VSIL, VNAC) receberam soluções de 100µL contendo  $10^8$  UFP do ZIKV, via ip. Os animais dos grupos tratados com Silimarina (CSIL e VSIL) receberam via gavagem 200 mg/kg/dia de Silimarina, começando o tratamento 24 horas antes da exposição ao vírus ou ao meio de cultura (tempo 0), sendo a dose dividida de 12 em 12 horas. Os animais dos grupos tratados NAC (CNAC e VNAC) receberam via gavagem 300 mg/kg/dia de N-acetilcisteína (NAC), começando o tratamento 24 horas da exposição ao vírus ou ao meio de cultura (tempo 0), sendo a dose dividida de 12 em 12 horas. As injeções foram realizadas com seringas de tuberculina (BD Plastipak, 0,38 x 13-27,5 G1/2, EUA).

A eutanásia foi realizada 3 dias pós-infecção (dpi). Esse dia foi escolhido se baseando no experimento piloto e estudos anteriores realizados pelo nosso grupo. Para tal, os animais foram previamente sedados e anestesiados com solução de cloridrato de ketamina (Ketamina® 10%, Agener União, Brasil) e cloridrato de xilazina (Kensol® Cloridrato de xilazina 2%, Konig, Brasil) via ip. A eutanásia foi feita por exsanguinação. Após coletar o sangue, realizou-se perfusão cardíaca com PBS 1X e foi retirado dos animais o fígado e o baço. As amostras de sangue total foram retiradas e centrifugadas a 5.000rpm por 10min a 4°C (centrífuga 5804 R, Eppendorf, Brasil) para obtenção do soro. O fígado, baço e soro foram mantidos em banho de gelo durante o procedimento e, em seguida, mantidos em freezer -80°C até o momento de uso. Todo procedimento foi realizado com auxílio de material cirúrgico estéril.



**Figura 13: Desenho experimental da etapa *in vivo*.** Os animais C57BL/6 foram divididos em 6 grupos (C, CSIL, CNAC, V, VSIL e VNAC), n=12, e infectados com  $10^8$  UFP de ZIKV via intraperitoneal, os controles receberam meio de cultura estéril para simular a infecção. Os tratados com Silimarina receberam 200mg/Kg por dia, sendo a dose dividida de 12 em 12 horas. Os animais tratados com NAC receberam 300mg/Kg por dia, sendo a dose também dividida de 12 em 12 horas. Os animais foram pré-tratados 24 horas antes da infecção e a eutanásia ocorreu 3 dpi.

#### 4.6 - Avaliação de Hepatomegalia e Esplenomegalia

O fígado e o baço de todos os camundongos (controles, infectados e tratados) foram pesados após eutanásia utilizando uma balança semi-analítica, com duas casas decimais (Marte Científica AD3300). Em seguida, foi realizado o cálculo da razão da massa dos órgãos em relação à massa total do camundongo.

#### 4.7 - Dosagem dos biomarcadores de estresse oxidativo

##### 4.7.1 - Ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O Malondialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica causada por ERO. Dessa maneira, é considerado um biomarcador de estresse oxidativo, indicando lesão celular. O MDA é capaz de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um composto cor de rosa avermelhado que pode ser mensurado em comprimento de onda de 535nm, conforme descrito por Buege e Aust (BUEGE; AUST, 1978).

Para a realização da dosagem de MDA foram homogeneizados cerca de 50mg de cada fígado em 500µL de tampão fosfato, pH 7,4, em banho de gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10min, a 4°C (centrífuga 5804R, Eppendorf, Brasil). O sobrenadante foi coletado e estocado em freezer -80°C por no máximo um mês. Posteriormente, em banho de gelo, em um microtubo, foram adicionados 250µL do homogenato do fígado (no caso do branco 200µL H<sub>2</sub>O) juntamente com 125µL de ácido tricloroacético (0,07g de TCA em 0,25 mL de HCL a 2%, por amostra) gelado e 125µL de ácido tiobarbitúrico (0,0025g de TBA em 0,25 mL de ácido acético a 50%, por amostra), as amostras foram vortexadas e incubadas por 15min em banho-maria a 95°C. Em seguida, as amostras foram deixadas em banho de gelo por 5min e foi realizada uma nova centrifugação a 13.000rpm por 10min, 4°C. Pipetou-se 200µL do sobrenadante de cada amostra em uma placa de 96 poços. Ainda, uma curva de calibração de MDA foi construída seguindo as proporções descritas na Tabela 1.

As leituras foram realizadas em modo fotométrico a 535 nm no leitor de microplaca tipo VICTORTM X3 Multilabel (Perkin Elmer, EUA), com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5. Os resultados expressos em nmol MDA / mg proteína total, para isso, a densidade ótica a 535 nm da amostra é multiplicada pelo fator de diluição e dividida pela inclinação da reta da curva de calibração multiplicada pelas proteínas totais.

Tabela 1: Curva de calibração com padrão MDA para dosagem de TBARS

Pontos da curva	Quantidade de MDA 500 $\mu$ M ( $\mu$ L)	Quantidade de água ( $\mu$ L)	Concentração ( $\mu$ mol/L)
1	500	--	500
2	100	400	100
3	250	250	50
4	250	250	25
5	250	250	12.5
6	250	250	6.25
7	250	250	3.125
8	250	250	1.562
9	250	250	0.781
10	250	250	0.39

#### 4.7.2 - Ensaio de Proteína Carbonilada

A Proteína Carbonilada é outro biomarcador de estresse oxidativo. A formação desses compostos carbonílicos ocorre em consequência da oxidação das proteínas por ERO. A dosagem de Proteína Carbonilada é realizada por meio da reação do composto 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com os grupos carbonila, gerando o 2,4-dinitrofenil-hidrazona (DNP), no qual diluído em dodecil sulfato de sódio (SDS) pode ser detectado a 370 nm em espectrofotômetro UV-visível.

Para este ensaio, foram homogeneizados cerca de 60mg de cada fígado em 600 $\mu$ L de tampão fosfato, pH 7,4, em banho de gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10min, a 4°C (centrífuga 5804R, Eppendorf, Brasil). O sobrenadante foi coletado e estocado em freezer -80°C por no máximo um mês. Posteriormente, em um microtubo, foram adicionados 200 $\mu$ L do homogenato do fígado e adicionados 200 $\mu$ L de TCA 20% (m/v). Em seguida, as

amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 500µL de DNPH, os quais foram incubados por 15min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, vortexando a cada 5min. Após incubação, foram adicionados 500µL de TCA 20% em cada microtubo, seguido de nova centrifugação a 5000 rpm por 5min a 4°C. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet lavado com adição de 1mL de etanol/acetato de etila (1:1) e subsequente centrifugação a 5000 rpm por 10min a 4°C (essa etapa de lavagem foi realizada duas vezes). O sobrenadante foi descartado e o pellet seco. Depois da secagem, foi ressuspendido em 1mL de SDS 6% (m/v) e centrifugado novamente a 10.000rpm por 5min a 4°C. Apenas SDS 6% foi utilizado como branco. A leitura foi realizada em cubetas de quartzo em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, EUA) a 370nm (Adaptado de Levine et al., 1994). A concentração das proteínas derivatizadas com DNPH foi calculada segundo a lei de Lambert-Beer, utilizando um coeficiente de absorção molar de 22.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado/mg de proteína.

#### 4.8 - Dosagem das defesas antioxidantes

##### 4.8.1 – Atividade total da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A realização dessa dosagem foi feita pelo método proposto por Marklund (1974), que se baseia na inibição da auto-oxidação do pirogalol. A auto-oxidação do pirogalol é dependente dos ânions superóxidos, dessa forma, na presença da enzima SOD ocorre a catalisação dos ânions superóxidos, impedindo assim a auto-oxidação do pirogalol. A auto-oxidação do pirogalol produz uma coloração amarelada cuja intensidade pode ser determinada por espectrofotômetro. Posto isso, uma unidade da enzima SOD (U SOD) é definida como a quantidade de enzima que reduz a auto-oxidação do pirogalol em 50%.

Para este ensaio, foram homogeneizados cerca de 20mg de cada fígado em 200µL de tampão fosfato, pH 7,4, em banho de gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10min, a 4°C (centrífuga 5804R,

Eppendorf, Brasil). O sobrenadante foi coletado e estocado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  por no máximo um mês. Posteriormente,  $30\mu\text{L}$  do homogenato foram pipetados em duplicata em uma placa de 96 poços, junto a  $15\mu\text{L}$  de pirogalol ( $15\text{mM}$ ),  $6\mu\text{L}$  de MTT ( $1,25\text{mM}$ ) e  $99\mu\text{L}$  de tampão fosfato. Para o branco foram utilizados  $144\mu\text{L}$  de tampão fosfato,  $15\mu\text{L}$  de pirogalol e  $6\mu\text{L}$  de MTT. Já para o padrão foram usados  $129\mu\text{L}$  de tampão fosfato,  $15\mu\text{L}$  de pirogalol e  $6\mu\text{L}$  de MTT. A mistura foi incubada por 5min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a reação foi interrompida por  $100\mu\text{L}$  de DMSO. A leitura foi realizada a  $595\text{nm}$  no leitor Victor X3 Multilabel (Perkin Elmer). A atividade de SOD foi expressa em U SOD/mg de proteína total, para isso é feita a razão entre a densidade ótica a  $595\text{ nm}$  da amostra e a do padrão, dividido pelo volume da amostra multiplicado pela proteína total.

#### 4.8.2 – Atividade da enzima Catalase (CAT)

A CAT é responsável por catalisar a deterioração do peróxido de hidrogênio em água e do oxigênio. Para esta dosagem foram homogeneizados cerca de  $20\text{mg}$  de cada fígado em  $200\mu\text{L}$  de tampão fosfato, pH 7,4, em banho de gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a  $10.000\text{ rpm}$ , por 10min, a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga 5804R, Eppendorf, Brasil). A enzima CAT foi dosada por meio da utilização de um método cinético, uma vez que uma unidade enzimática de catalase (U CAT) decompõe  $1\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por mg de proteína em 1 minuto (Moehl; Chance, 1954). Para cada amostra foram adicionados  $10\mu\text{L}$  do homogenato e  $990\mu\text{L}$  de mix (PBS mais  $40\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  - 30%) no momento de uso, mantido ao abrigo da luz. A absorbância foi medida imediatamente em um espectrofotômetro UV-visível a  $240\text{nm}$ , utilizando cubetas de quartzo, durante 1min para que o consumo de peróxido de hidrogênio fosse acompanhado (Adaptado de Aebi, 1984). A atividade de CAT foi expressa em U CAT/mg proteína total, para isso foi feita a subtração entre a densidade ótica a  $595\text{ nm}$  no tempo 0 e no tempo 60 segundos, multiplicados por 1000 e dividido pelo coeficiente de extinção molar ( $43,6\text{ 4 mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) multiplicado pelas proteínas totais.

#### 4.9 - Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi necessária para a determinação dos níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. As proteínas totais foram determinadas pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando o Concentrate Reagent (Bio-Rad Protein Assay). Esse corante reage com as proteínas por meio aminoácidos de cadeias laterais básicos ou aromáticos, deixando a solução de coloração azulada, caso haja uma grande quantidade de proteínas. Para a dosagem, foi feita uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA), com sete pontos e com concentrações variando de 2 a 0,03mg/mL. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 10 $\mu$ L de cada amostra ou pontos da curva padrão juntamente com 190 $\mu$ L do corante Bio-Rad Protein Assay (diluído 1:4), em duplicata. A leitura da absorbância foi feita no leitor Victor X3 Multilabel (Perkin Elmer) a 595nm. O cálculo da concentração de proteínas se deu pela equação da reta gerada pela curva padrão, sendo expressa em mg/mL.

#### 4.10 - Titulação de vírus do fígado de camundongos C57BL/6

Para analisar a atividade antiviral da Silimarina e da NAC contra o ZIKV em camundongos C57BL/6, foram titulados em células Vero os sobrenadantes dos homogenatos do fígado de 11 animais infectados, 11 animais infectados e tratados com a Silimarina e 11 animais infectados e tratados com a NAC. Além disso, foi utilizado um controle de células e um controle de vírus. Para isso, foram homogeneizados cerca de 30mg de cada fígado em 600 $\mu$ L de tampão fosfato, pH 7, em banho de gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10min, a 4°C (centrífuga 5804R, Eppendorf, Brasil). A titulação foi realizada conforme o item 4.2 e revelada depois de 3 dias. Os resultados foram expressos em Log UFP/grama de fígado.

#### 4.11 - Compostos utilizados nos ensaios *in vitro*

Foram utilizados 4 compostos para a realização dos ensaios *in vitro*: Silimarina, N-acetilcisteína (NAC), Quercetina e Rutina.

A Silimarina foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich (EUA) e diluída em DMSO (2mg de Silimarina em 1mL de DMSO). As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C. A concentração utilizada foi de 100µg/ml, baseando-se em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de estudos (Silva et al., 2020).

A N-acetilcisteína (NAC) foi obtida comercialmente da EMS (Brasil) na concentração de 40mg/mL. O NAC foi filtrado em uma capela de fluxo laminar, através de um filtro acoplado a uma seringa. As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C. A dose de 10mM foi definida a partir de dados encontrados na literatura (Cavalheiro et al., 2016).

A Quercetina foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich (EUA) e diluída em DMSO (3,02 mg de Quercetina em 1mL de DMSO). As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C. Dado que, o tratamento com a Quercetina em células Vero não resulta em citotoxicidade em concentrações menores que 100µM (Qiu et al., 2016), a dose de 50µM foi escolhida se baseando na literatura (De Araújo et al., 2016).

A Rutina foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich (EUA) e diluída em DMSO (6,1 mg de Rutina em 1mL de DMSO). As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C. Visto que o tratamento com a Rutina em células Vero não resulta em citotoxicidade em concentrações menores que 1000µg/mL (Nizer et al., 2020), a dose de 50µM foi escolhida se baseando na literatura (De Araújo et al., 2016).

#### 4.12 - Avaliação do *status oxidante in vitro*

##### 4.12.1 - Dosagem das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A dosagem de ERO foi realizada por meio do Kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (Invitrogen®, EUA). Esse Kit permite a detecção de ERO mediante fluorescência. A técnica utiliza um marcador fluorogênico (5-ou-6)-carboxy-2',7'26 dichlorodihydro fluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA), que quando quebrado por

esterases intracelulares não específicas gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as ERO tornando-se fluorescente.

Os ensaios foram realizados em placas brancas de poliestireno de 96 poços, nas quais foram adicionadas  $2,5 \times 10^4$  células Vero (em meio DMEM HG) em cada cavidade e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para aderência. Após esse tempo, o meio DMEM HG foi descartado e as células foram lavadas com solução salina equilibrada de Hanks (HBSS) pH 7,4. Acrescentaram-se os compostos às células e logo depois essas foram infectadas com ZIKV em uma MOI de 5 (multiplicidade de infecção) utilizando o meio 199 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, EUA). Um total de 8 poços de células foram usados como controle negativo, 8 poços de células foram infectados com ZIKV, 8 poços de células foram infectados com ZIKV previamente inativado por luz ultravioleta (UV) e 8 poços de células foram infectados com ZIKV e tratados com cada composto. A N-acetilcisteína foi utilizada em uma concentração de 10mM, a Silimarina em concentração de 100µg/mL, a Quercetina e a Rutina em concentração de 50µM.

Após 15 e 24 horas pós infecção (hpi) as células foram lavadas 2 vezes com HBSS e incubadas com 100µL/poço da sonda carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA (25µM) por 45min a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, no escuro. Após a incubação, foram feitas leituras da intensidade de fluorescência à 485/535nm (excitação/transmissão) utilizando o leitor de microplaca tipo VICTORTM X3 Multilabel (Perkin Elmer, EUA), com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes com três replicatas cada.

#### 4.13 - Ensaio de Atividade Antiviral

Para a realização deste ensaio foram utilizadas placas de 96 poços das quais foram adicionadas  $5 \times 10^4$  células Vero (em meio DMEM HG) em cada poço e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para aderência. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados os compostos, nas concentrações indicadas acima, e logo depois a suspensão viral de ZIKV numa MOI de 5, sendo 12 poços de controle de células, 12 poços de células infectadas com ZIKV (controle de vírus) e 12 poços de células para cada composto mais ZIKV. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas. Após a incubação, o sobrenadante das células foi coletado. Em seguida,

o sobrenadante das células foi titulado em placas de 12 poços contendo células Vero (n=6), conforme item 4.2, sendo que cada placa continha um poço de controle de células (não tratado e não infectado) e um controle de vírus (infectado e não tratado).

#### 4.13.1 - Avaliação da viabilidade celular por MTT

Para a realização desse experimento, células Vero foram distribuídas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células/poço) e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para aderência. O meio foi removido e os compostos candidatos foram adicionados, nas concentrações indicadas acima, juntamente com 100µL de suspensão viral (MOI de 5). Após 48h, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 20 µL de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5 – difeniltetrazol (MTT) (2 mg/mL) por poço e as placas foram incubadas por 1h. Posteriormente, foram adicionados 85µL do solvente DMSO (dimetilsulfóxido) em cada poço. O MTT é um composto que é reduzido por células com metabolismo ativo (viáveis), sendo convertido em cristais de formazam (cristais realizar essa conversão. Os cristais de formazam necessitam do DMSO para que sejam dissolvidos, uma vez que são insolúveis. Desse modo, a viabilidade celular é mensurada de forma indireta a partir da quantificação de cristais formazam produzidos (MOSMANN, 1983). A quantidade de formazam gerada foi mensurada por meio da leitura da absorbância a 490 nm no leitor de placas Victor X3 (PerkinElmer).

#### 4.14 - Análise estatística

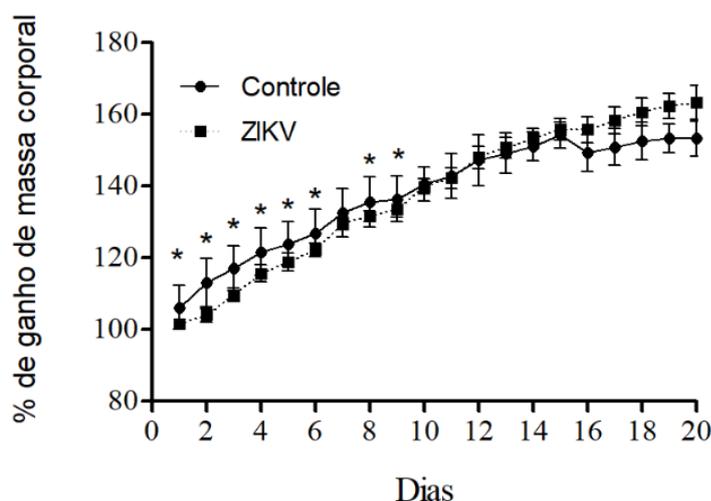
Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 7.0, utilizando-se o teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ) e o resultado representa a Média  $\pm$  SEM de cada grupo.

## 5 - RESULTADOS

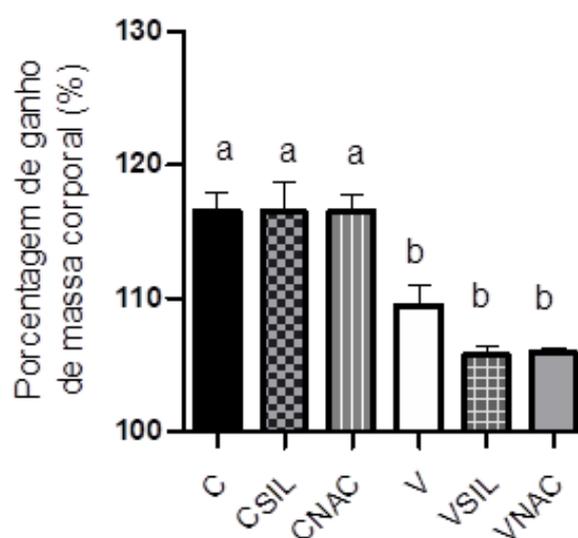
### 5.1 - Sinais clínicos

#### 5.1.1 - Avaliação da massa corporal de camundongos C57BL/6

O experimento piloto com os animais C57BL/6 selvagens de 21 dias infectados com o ZIKV mostrou nenhuma mortalidade e nenhum sinal clínico aparente, como piloereção, prostração, perda de peso e arqueamento de dorso (Silva, H., 2018), até o 20º dia de infecção. No entanto, como mostrado na Figura 14, os animais infectados não ganharam peso como os controles, até um período de 10 dias. Em seguida, para determinar se a Silimarina e a NAC poderiam reverter o quadro de menor ganho de massa corpórea, avaliou-se novamente a porcentagem de ganho de massa corporal dos camundongos no 3º dpi. A Figura 15 mostra que o tratamento com Silimarina e NAC não restaurou a porcentagem de ganho de massa corporal em camundongos C57BL/6 após infecção por ZIKV (V, VSIL e VNAC), quando comparado aos controles (C, CSIL e CNAC), 3 dias após a infecção.



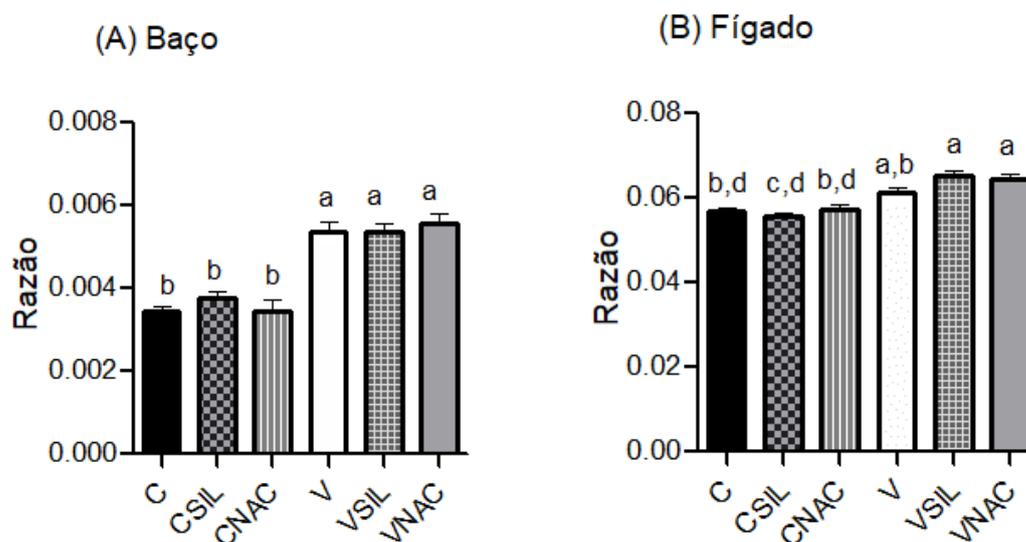
**Figura 14: Porcentagem de ganho de massa corporal de animais controles e infectados.** O ganho de massa corporal dos animais controles e infectados foram registrados por 20 dias e os resultados estão expressos como a porcentagem de ganho de massa média em relação ao peso inicial dos animais. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  SD (infectados  $n=8$  e controle  $n=4$ ). \* representa diferenças significativas entre o ganho de peso corporal dos animais controles e infectados (\* $P < 0.05$ , teste t-Student).



**Figura 15: Tratamento com Silimarina e NAC não restaura a porcentagem de ganho de massa corporal em camundongos C57BL/6 3 dias após infecção por ZIKV.** A massa corporal dos animais de cada grupo ( $n=12$ ) foi registrada antes da infecção (dia 0) e no dia da eutanásia (dia 3), os dados são expressos como média  $\pm$  SEM, onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística ( $p < 0,05$ , ANOVA).

## 5.2 - Análise de Esplenomegalia e Hepatomegalia

Os animais infectados com o ZIKV (V) apresentaram aumento significativo de massa do baço em relação aos animais dos grupos controles (C, CSIL e CNAC), mostrando que a infecção leva a um quadro de esplenomegalia (Figura 16A). No entanto, o quadro não foi revertido com o tratamento de Silimarina e NAC (VSIL e VNAC). Já os camundongos infectados (V) não apresentaram aumento de fígado em relação aos animais controles (C), como mostrado na figura 16B. No entanto, os animais dos grupos infectado e tratado com Silimarina (VSIL) e infectado e tratado com NAC (VNAC) mostraram um aumento da massa do fígado em relação aos animais dos grupos controles (C, CSIL e CNAC).



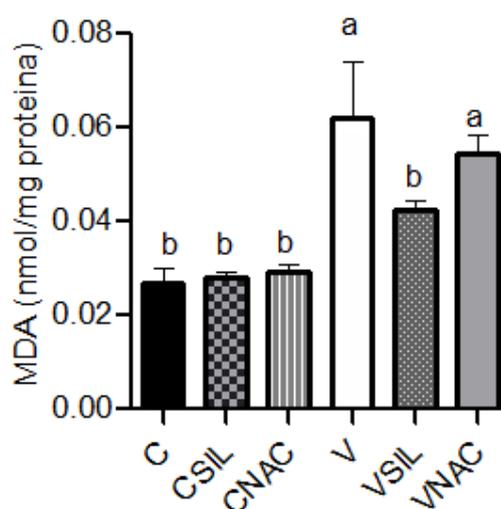
**Figura 16: Razão da massa do baço e fígado em relação à massa corporal de animais C57BL/6 infectados com ZIKV e tratados com Silimarina e NAC.** Camundongos C57BL/6 controles, infectados com ZIKV ou infectados com ZIKV e tratados com Silimarina e NAC foram eutanasiados no 3º dpi e os pesos do baço e fígado mensurados. A razão foi obtida pela massa do baço (A) ou do fígado (B) em relação à massa total do animal. Os dados apresentam a média ± SEM dos grupos (n=12/grupo), onde letras diferentes (a,b,c,d) representam diferença estatística (p<0,05, ANOVA). C: animais controles; CSIL: animais controles tratados com Silimarina; CNAC: animais controles tratados com NAC; V: animais infectados com ZIKV; VSIL: animais infectados com ZIKV e tratados com Silimarina; VNAC: animais infectados com ZIKV e tratados com NAC.

### 5.3 - Análise da ação antioxidante da Silimarina e da NAC

#### 5.3.1 - Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo no fígado

##### 5.3.1.1 - Malondialdeído (MDA)

A partir da Figura 17, pode-se verificar que a infecção pelo ZIKV aumentou significativamente as concentrações de MDA no fígado dos camundongos infectados com o ZIKV (V), quando comparado aos controles (C, CSIL e CNAC). Os animais infectados que receberam o tratamento com a Silimarina (VSIL) demonstraram uma diminuição de MDA em comparação ao grupo infectado (V) e níveis semelhantes de MDA com os controles (C, CSIL e CNAC) (Figura 17). O grupo infectado e tratado com NAC (VNAC) apresentou níveis aumentados de MDA, semelhante ao observado no fígado dos animais do grupo infectado (V), mostrando que, diferente da Silimarina, o tratamento com a NAC não foi capaz de diminuir os níveis de MDA após a infecção (Figura 17).

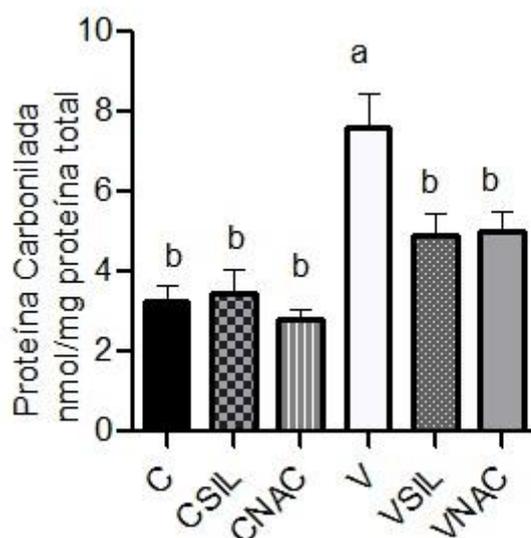


**Figura 17: Tratamento com Silimarina restabelece os níveis de MDA no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6 controles, infectados com ZIKV ou infectados com ZIKV e tratados com Silimarina e NAC foram eutanasiados no 3º dpi e os níveis de MDA, biomarcador de estresse oxidativo, foram avaliados no fígado dos animais. Os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM (n=12/grupo), onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística (p<0,05, ANOVA). C: animais controles; CSIL: animais controles tratados com Silimarina; CNAC: animais controles tratados com NAC; V: animais infectados com ZIKV; VSIL:

animais infectados com ZIKV e tratados com Silimarina; VNAC: animais infectados com ZIKV e tratados com NAC.

### 5.3.1.2 - Proteína Carbonilada

A partir da Figura 18, pode-se verificar que a infecção pelo ZIKV aumentou significativamente os níveis de Proteína Carbonilada no fígado dos camundongos (V), quando comparado aos controles (C, CSIL e CNAC). Os animais infectados que receberam o tratamento com a Silimarina e NAC (VSIL e VNAC) demonstraram uma diminuição de Proteína Carbonilada em comparação ao grupo infectado (V) e níveis semelhantes com os controles (C, CSIL e CNAC) (Figura 18).

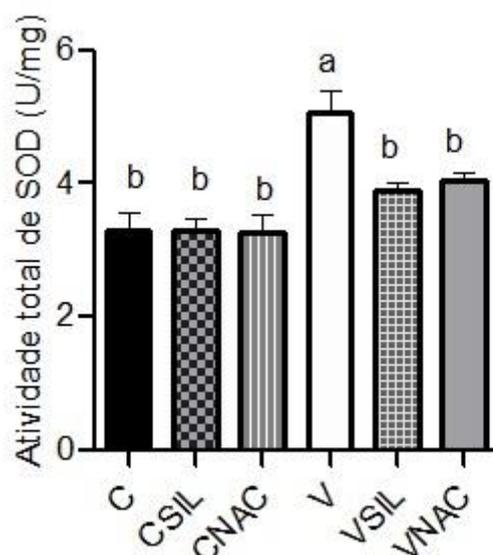


**Figura 18: Tratamento com Silimarina e NAC restabelece os níveis de proteína carbonilada no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6 controles, infectados com ZIKV ou infectados com ZIKV e tratados com Silimarina e NAC foram eutanasiados no 3º dpi e os níveis de proteína carbonilada, biomarcador de estresse oxidativo, foram avaliados no fígado dos animais. Os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM (n=12/grupo), onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística ( $p < 0,05$ , ANOVA). C: animais controles; CSIL: animais controles tratados com Silimarina; CNAC: animais controles tratados com NAC; V: animais infectados com ZIKV; VSIL: animais infectados com ZIKV e tratados com Silimarina; VNAC: animais infectados com ZIKV e tratados com NAC.

### 5.3.2 - Avaliação do *status* antioxidante no fígado dos animais

#### 5.3.2.1 - Atividade da enzima Superóxido Dismutase

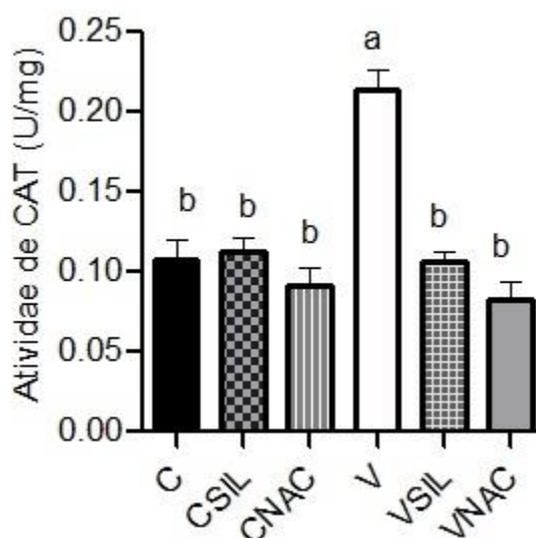
A partir da Figura 19, pode-se verificar que a infecção pelo ZIKV aumentou significativamente a atividade total da enzima SOD no fígado dos camundongos (V), quando comparado aos controles (C, CSIL e CNAC). Já o tratamento com Silimarina e NAC diminuiu a atividade enzimática da SOD no fígado dos animais infectados (VSIL e VNAC), com níveis semelhantes aos observados nos grupos controles (C, CSIL e CNAC) (Figura 19).



**Figura 19: O tratamento com Silimarina e NAC restabeleceu a atividade enzimática da SOD no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6 controles, infectados com ZIKV ou infectados com ZIKV e tratados com Silimarina e NAC foram eutanasiados no 3º dpi e a atividade total da enzima SOD foi dosada no fígado dos animais. Os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM (n=12/grupo), onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística ( $p < 0,05$ , ANOVA). C: animais controles; CSIL: animais controles tratados com Silimarina; CNAC: animais controles tratados com NAC; V: animais infectados com ZIKV; VSIL: animais infectados com ZIKV e tratados com Silimarina; VNAC: animais infectados com ZIKV e tratados com NAC.

## 5.3.2.2 - Atividade da enzima Catalase

Como pode ser observado na Figura 20, a infecção pelo ZIKV aumentou significativamente a atividade da enzima CAT no fígado dos camundongos (V), quando comparado aos controles (C, CSIL e CNAC). Por sua vez, o tratamento com Silimarina e NAC diminuiu a atividade enzimática da CAT no fígado dos animais infectados (VSIL e VNAC), com níveis semelhantes aos observados no fígado dos animais dos grupos controles (C, CSIL e CNAC) (Figura 20).

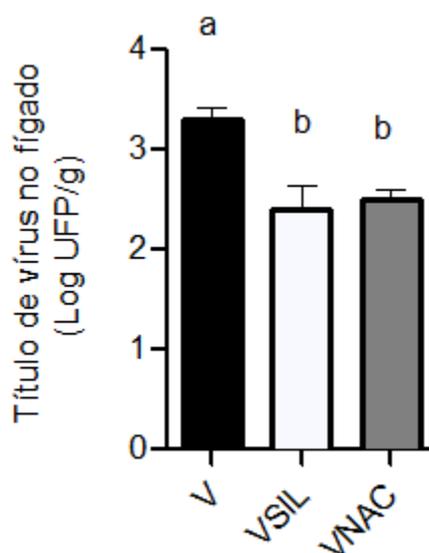


**Figura 20: O tratamento com Silimarina e NAC restabeleceu a atividade enzimática da CAT no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV.** Camundongos C57BL/6 controles, infectados com ZIKV ou infectados com ZIKV e tratados com Silimarina e NAC foram eutanasiados no 3º dpi e a atividade da enzima CAT foi dosada no fígado dos animais. Os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM (n=12/grupo), onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística ( $p < 0,05$ , ANOVA). C: animais controles; CSIL: animais controles tratados com Silimarina; CNAC: animais controles tratados com NAC; V: animais infectados com ZIKV; VSIL: animais infectados com ZIKV e tratados com Silimarina; VNAC: animais infectados com ZIKV e tratados com NAC.

## 5.4 - Análise da atividade antiviral da Silimarina e da N-acetilcisteína

### 5.4.1 - Titulação do fígado de camundongos C57BL/6

Para analisar a atividade antiviral da Silimarina e da NAC contra o ZIKV, foram titulados em células Vero os sobrenadantes dos homogenatos do fígado dos camundongos C57BL/6 dos grupos infectado (V), infectado e tratado com Silimarina (VSIL) e infectado e tratado com NAC (VNAC). Conforme a Figura 21, a carga viral no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV foi reduzida após tratamento com Silimarina e NAC.



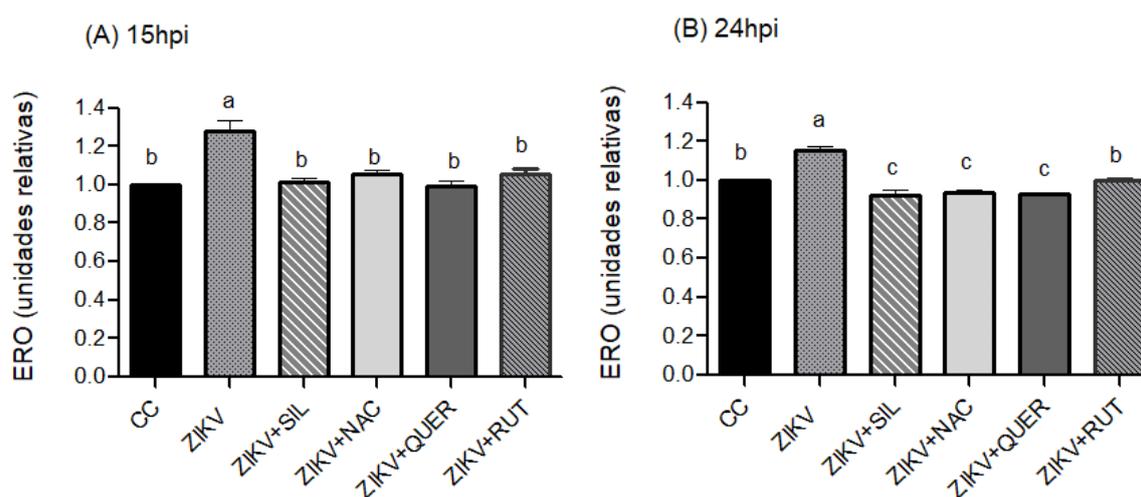
**Figura 21: A carga viral no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por ZIKV é reduzida após tratamento com Silimarina e NAC.** Camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV ou infectados com ZIKV e tratados com Silimarina e NAC foram eutanasiados no 3º dpi. Para analisar a atividade antiviral da Silimarina e do NAC contra o ZIKV, foram titulados em células Vero os sobrenadantes dos homogenatos do fígado desses animais. Os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM (n=11/grupo), onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística ( $p < 0,05$ , ANOVA). V: animais infectados com ZIKV; VSIL: animais infectados com ZIKV e tratados com Silimarina; VNAC: animais infectados com ZIKV e tratados com NAC.

## 5.5 - Avaliação da atividade antioxidante e antiviral da Silimarina, NAC, Quercetina e Rutina na infecção *in vitro* pelo ZIKV

### 5.5.1 – Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliar a ação dos antioxidantes (Silimarina, NAC, Quercetina e Rutina) na infecção pelo ZIKV, foram mensurados os níveis de ERO em células Vero infectadas e tratadas com os diferentes compostos. Já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que o estresse oxidativo ocorre na infecção pelo ZIKV *in vitro*, decorrente do aumento da produção de ERO (Almeida et al., 2020).

Como pode ser visto na Figuras 22 (A, B), a infecção pelo ZIKV aumentou a produção de ERO em relação às células controles (CC), confirmando estudos prévios do nosso grupo. Já o tratamento com os diferentes compostos (Silimarina, NAC, Quercetina e Rutina) foi capaz de diminuir a produção de ERO 15 e 24h após a infecção com o ZIKV, em relação às células somente infectadas, confirmando suas ações antioxidantes.



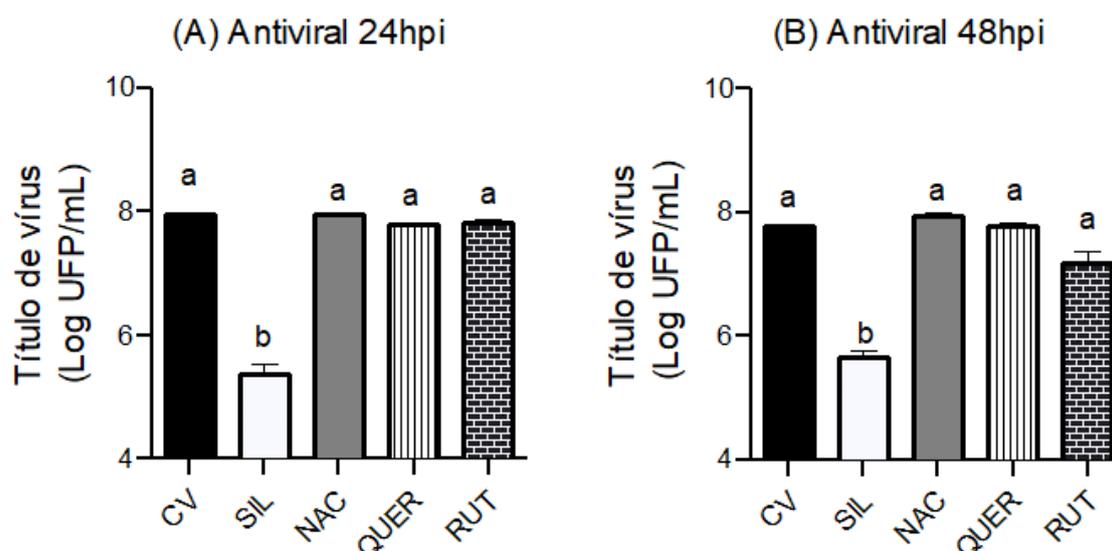
**Figura 22: Diminuição das ERO em células infectadas com ZIKV e tratadas com Silimarina, NAC, Quercetina e Rutina.** Células Vero foram infectadas com ZIKV em uma MOI de 5 e tratadas com a Silimarina (100µg/ml), NAC (10mM), Quercetina (50µM) e Rutina (50µM). Nos tempos de 15 (A) e 24 (B) horas pós-infecção (hpi), as células foram carregadas com 25µM da sonda carboxi-H2DCFDA. A quantidade de ERO produzidas foi medida e representada como % da intensidade média de fluorescência em relação ao controle de células (CC). Os dados são expressos como a média ± SEM (n=8), onde letras diferentes (a,b,c) representam diferença estatística (p<0,05, ANOVA).

## 5.6 - Análise da atividade antiviral

Para continuar o estudo sobre a possível ligação da atividade antioxidante dos compostos à atividade antiviral, foi realizado um ensaio de atividade antiviral, a fim de verificar se a produção de ERO pode ser importante para a multiplicação do ZIKV.

Como pode ser observado na Figura 23 (A, B), o título do ZIKV em células Vero foi reduzido após tratamento com a Silimarina nos tempos de 24 e 48 horas pós-infecção (hpi), confirmando resultados prévios demonstrados por nosso grupo (Silva et al., 2020). Por sua vez, nenhum dos outros antioxidantes testados, NAC, Quercetina e Rutina, apresentaram redução dos títulos virais, ou seja, não demonstraram nenhum efeito anti-ZIKV. A discrepância entre os resultados obtidos com a NAC *in vivo* e *in vitro* necessitam de mais estudos para ser entendida. Nossa hipótese é que, no sistema *in vivo*, onde outros fatores possam interferir com a multiplicação do ZIKV no fígado, e que compostos que melhorem o funcionamento desse órgão possam de alguma forma interferir na multiplicação viral.

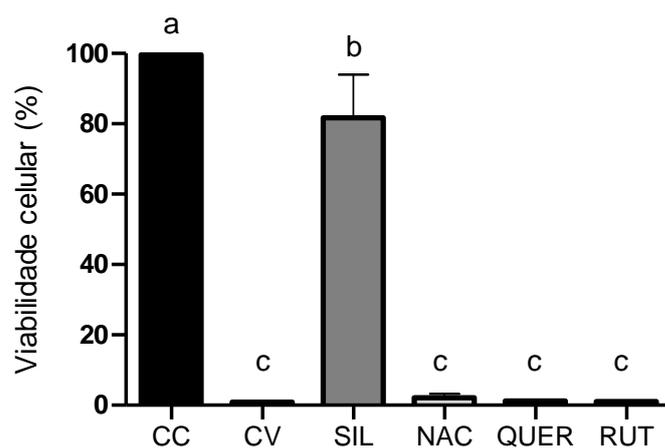
Dessa forma, podemos inferir que ter atividade antioxidante via inibição de ERO não garante que um determinado composto apresente atividade antiviral contra o ZIKV. Provavelmente, a produção de ERO não seja é um fator que contribua de forma significativa para aumentar a multiplicação do ZIKV. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.



**Figura 23: Título de ZIKV em células Vero tratadas com diferentes compostos após 24 e 48 horas pós-infecção (hpi).** Células Vero foram infectadas com ZIKV (MOI 5) e tratadas com Silimarina (100 $\mu$ g/ml), NAC (10mM), Quercetina (50 $\mu$ M) e Rutina (50 $\mu$ M). Após 24 e 48 horas, os sobrenadantes das células foram coletados e titulados em células VERO para determinação dos títulos virais. Os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM (n=6), onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística ( $p < 0,05$ , ANOVA). CV: controle de vírus (células infectadas e não tratadas); SIL: células infectadas e tratadas com Silimarina; NAC: células infectadas e tratadas com NAC; QUER: células infectadas e tratadas com Quercetina; RUT: células infectadas e tratadas com Rutina.

#### 5.6.1 - Análise da viabilidade celular por MTT

Para a confirmação do ensaio de titulação, foi realizado um ensaio de viabilidade celular, em que células Vero foram infectadas com ZIKV (MOI de 5) e tratadas com Silimarina (100 $\mu$ g/ml), NAC (10mM), Quercetina (50 $\mu$ M) ou Rutina (50 $\mu$ M). Após 48h a viabilidade das células foi revelada pelo ensaio de MTT. Conforme a Figura 24, observa-se que a viabilidade celular foi reduzida em todos os grupos, exceto o tratado com a Silimarina, corroborando com os resultados obtidos na titulação.



**Figura 24: Viabilidade celular de células Vero infectadas com o ZIKV e tratadas com diferentes compostos.** Células Vero foram infectadas com ZIKV (MOI de 5) e tratadas com Silimarina (100µg/ml), NAC (10mM), Quercetina (50µM) ou Rutina (50µM). Após 48h a viabilidade das células foi revelada pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como a média  $\pm$  SEM (n=12), onde letras diferentes (a,b,c) representam diferença estatística ( $p < 0,05$ , ANOVA). CC: controle de células (células não infectadas e não tratadas); CV: controle de vírus (células infectadas e não tratadas); SIL: células infectadas e tratadas com Silimarina; NAC: células infectadas e tratadas com NAC; QUER: células infectadas e tratadas com Quercetina; RUT: células infectadas e tratadas com Rutina.

## 6 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O ZIKV é um flavivírus emergente que infectou e causou doença em um grande número de pessoas, especialmente entre os anos de 2015 e 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). A epidemia de ZIKV em países do continente Americano revelou manifestações clínicas que não haviam sido observadas em surtos anteriores. Dentre essas manifestações, destacam-se danos neurológicos graves como: microcefalia, encefalite, meningoencefalite e síndrome de Guillain-Barré (Figueiredo et al., 2019).

Entre o período de 29 de dezembro de 2019 a 29 de dezembro de 2020, foram notificados 7.387 casos prováveis de Zika no Brasil (taxa de incidência 3,5 casos/100 mil habitantes). A região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (9,2 casos/100 mil habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (3,6 casos/100 mil habitantes) e Norte (2,8 casos/100 mil habitantes). O estado da Bahia apresentou a maior concentração de casos do país, 47,9%. Nesse período também foram notificados 609 casos prováveis de Zika em gestantes, dos quais 214 casos foram confirmados no país. Entre 14 de fevereiro de 2021 a 27 de fevereiro de 2021 foram notificados 448 casos prováveis de Zika, correspondendo a uma taxa de incidência 0,21 casos por 100 mil habitantes no país (Ministério da Saúde, 2020; Ministério da Saúde, 2021). Esses dados mostram que a circulação do ZIKV no Brasil é ainda considerável. No entanto, apesar de toda sua importância, ainda assim, muitos aspectos sobre a patogênese desse arbovírus permanecem desconhecidos e não há vacina nem antivirais disponíveis.

Dessa forma, a fim de tentar entender um pouco mais sobre a patogênese do ZIKV, nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que o estresse oxidativo ocorre durante a infecção *in vitro* e *in vivo*, podendo ser um fator importante no desenvolvimento e progressão da doença (Almeida et al., 2020). Ainda, na tentativa de encontrar possíveis substâncias com promissora atividade antiviral, demonstramos *in vitro* uma potente atividade anti-ZIKV da Silimarina (Silva et al., 2020). Dessa forma, dando continuidade a esses estudos, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e antiviral da Silimarina na infecção *in vivo* pelo ZIKV, utilizando camundongos C57BL/6, e comparar seus efeitos com outro composto antioxidante bem descrito na literatura, a N-acetilcisteína (NAC). Ainda, avaliamos *in*

*vitro* o papel da ERO na multiplicação do vírus, utilizando além da Silimarina e NAC, outros antioxidantes, a Quercetina e Rutina. Esses compostos foram testados quanto suas capacidades em inibir a produção de ERO após a infecção, bem como inibir a multiplicação do ZIKV, em células Vero.

Para a realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens, de 21 dias de idade, com base em dados publicados na literatura e estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (Almeida et al., 2020; Yu et al., 2017). Camundongos selvagens são comumente resistentes à infecção pelo ZIKV, apresentando 100% de sobrevivência, sendo essa susceptibilidade dependente principalmente da idade (Silva H., 2018; Pena et al., 2018; Li et al., 2018). Li e colaboradores demonstraram que animais C57BL/6 com 5 e 7 dias de vida infectados com o ZIKV apresentam taxa de mortalidade de 90,9% e 55,6%, respectivamente. Por outro lado, animais mais velhos com 14 e 21 dias de vida sobrevivem à infecção (Li et al., 2018). Assim, escolhemos utilizar animais de 21 dias pois, assim como ocorre na maioria das infecções em humanos, a doença nesses animais não é letal, e desenvolve-se de maneira assintomática ou com sintomas leves. Além disso, nesses animais que passaram por desmame, foi possível administrar a Silimarina e a NAC via gavagem, que é uma via que permite um bom controle de ingestão e mimetiza a via de administração natural desses compostos, a via oral.

Em concordância com trabalhos prévios, nossos resultados obtidos mostraram que os animais foram resistentes à infecção pelo ZIKV, uma vez que todos sobreviveram até o 20º dia pós infecção. Além disso, os animais infectados não apresentaram sinais clínicos aparentes, como piloereção, prostração, arqueamento de dorso e perda de peso. No entanto, considerando que animais de 21 dias ainda estão em fase de crescimento e engorda, avaliamos o percentual de ganho de massa dos animais infectados, em relação aos animais controles, para determinar se a infecção estaria prejudicando o desenvolvimento desses animais. Os resultados mostraram que os animais infectados com ZIKV não ganharam peso como os animais controles até o 10º dia pi, corroborando com estudos anteriores (Yu et al., 2017; Almeida et al., 2020).

Considerando que o menor ganho de massa corpórea foi o único sinal clínico evidente observado nos camundongos C57BL/6 de 21 dias infectados com o ZIKV, o próximo passo foi avaliar se o tratamento com a Silimarina e a NAC poderia auxiliar

na melhora desse quadro. A administração de nenhum desses compostos, nas concentrações usadas, foi capaz de restaurar o desenvolvimento da massa corporal nos animais infectados até o 3º dia da infecção.

Ainda, os animais infectados com o ZIKV apresentaram um quadro de esplenomegalia, que também não foi revertido com nenhum dos tratamentos (Silimarina ou NAC). De forma diferente, em um outro trabalho feito pelo nosso grupo utilizando camundongos BALB/c infectados com o *Mayaro virus* (MAYV) e tratados com a Silimarina, foi observado que o quadro de esplenomegalia ocasionado pela infecção foi totalmente revertido após 5 dias de tratamento (Ferraz et al., 2021). Ainda, aqui, os camundongos C57BL/6 infectados com o ZIKV não apresentaram hepatomegalia até o dia em que foram eutanasiados (3º dpi). Na literatura, existe um estudo de Cardona e Morales (2016) que relata hepatomegalia em uma paciente infectada com o ZIKV (Cardona; Morales, 2016).

Apesar de não mostrar melhora no quadro clínico e na esplenomegalia após a infecção pelo ZIKV, o tratamento com ambos os compostos foi capaz de restabelecer a homeostase redox no fígado dos animais infectados, com diminuição dos marcadores de estresse oxidativo MDA e proteína carbonilada e diminuição das enzimas antioxidantes SOD e CAT. O fígado foi escolhido para se estudar a homeostase redox frente à infecção desde que é sabido que o ZIKV é capaz de se multiplicar em células hepáticas (Sherman et al., 2019) e o fígado é um dos órgãos principais onde ocorre ativa multiplicação viral com posterior disseminação (Waldorf et al., 2016). Além disso, nesse modelo, os animais não desenvolvem doença neurológica por serem já resistentes à infecção.

Nossos resultados reforçam a ação antioxidante da Silimarina e são semelhantes aos resultados de um estudo recente publicado por nosso grupo, que demonstrou que os níveis de MDA e proteína carbonilada são restabelecidos no fígado de animais BALB/c infectados com MAYV e tratados com a Silimarina (Ferraz et al., 2021). Com relação a NAC, outro estudo presente na literatura corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, o tratamento com o NAC modulou o estresse oxidativo induzido por DENV em camundongos BALB/c infectados com DENV, restabelecendo as enzimas antioxidantes SOD e CAT aos níveis dos controles (Sreekanth et. al., 2019).

Em relação aos antioxidantes enzimáticos, foi demonstrado neste trabalho que

a infecção pelo ZIKV aumentou significativamente a atividade de SOD e CAT no fígado dos camundongos infectados, quando comparado aos controles, e o tratamento com Silimarina e NAC diminuiu a atividade dessas enzimas, comparando-a a atividade encontrada no fígado dos animais controles.

De forma contrária ao que observamos aqui, nosso grupo de pesquisa observou em um estudo prévio usando camundongos C57BL/6 neonatos infectados com o ZIKV, uma diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT no fígado dos animais infectados (Almeida et al., 2020). Ainda, essa diminuição da atividade de SOD e CAT observada nesse estudo foi relacionada a inibição Nrf2, que é um dos principais reguladores do sistema antioxidante celular. Como já discutido anteriormente, a susceptibilidade à infecção pelo ZIKV em modelo murino selvagem é dependente da idade, sendo que os animais neonatos sucumbem à infecção com mortalidade próxima de 80% (Li et al., 2018; Almeida et al., 2020), enquanto os de 21 dias já são totalmente resistentes (Li et al., 2018). Dessa forma, pode ser que diferenças na atividade das enzimas antioxidantes sejam observadas dependendo do contexto e da gravidade da infecção pelo ZIKV.

Foi observado que os animais infectados apresentaram um aumento de SOD e CAT em comparação aos controles, isso provavelmente se deve ao fato da infecção por ZIKV causar o aumento de ERO (Almeida et al., 2020) e assim, por consequência, poderia ocorrer uma modulação positiva da via Nrf2, causando o aumento das enzimas antioxidantes para conter essas espécies reativas de oxigênio. O tratamento com a Silimarina e NAC foi capaz de restabelecer os níveis de SOD e CAT aos níveis dos animais controles, comprovando a capacidade antioxidante desses compostos.

Em conjunto, esses resultados nos permitem inferir que o tratamento com a Silimarina e a NAC se mostrou promissor no restabelecimento dos parâmetros redox no fígado de camundongos C57BL/6 de 21 dias infectados com ZIKV. Mesmo que a NAC não tenha diminuído os níveis de MDA após a infecção, esse composto diminuiu os níveis de Proteína Carbonilada e restabeleceu a atividade de SOD e CAT no fígado dos camundongos infectados.

Em seguida, avaliamos se a Silimarina e a NAC poderiam apresentar alguma atividade anti-ZIKV *in vivo*. Para isso, medimos a carga viral no fígado dos animais infectados e no fígado dos animais infectados e tratados com os diferentes compostos. Um estudo prévio do nosso grupo já havia demonstrado que, *in vitro*, a

Silimarina diminui a multiplicação do ZIKV (Silva et al., 2020). Aqui, também observamos uma menor quantidade de vírus no fígado dos animais infectados com ZIKV e tratados com a Silimarina, confirmando seus efeitos antivirais contra esse vírus. Já com relação a NAC, até o desenvolvimento desse trabalho, não existiam trabalhos na literatura demonstrando seu efeito antiviral contra o ZIKV, e de forma semelhante à Silimarina, uma menor quantidade de vírus foi encontrada no fígado dos animais infectados e tratados com esse composto. Assim, de alguma forma, o tratamento com a NAC, além de restabelecer os parâmetros redox no fígado dos animais infectados, foi capaz também de diminuir a multiplicação do ZIKV.

A ação antiviral da Silimarina para outros vírus já foi relatada por estudos do nosso grupo de pesquisa. Camini e colaboradores (2018) demonstraram atividade anti-MAYV da Silimarina em células hepáticas humanas HepG2 e Ferraz e colaboradores (2021) confirmaram sua ação anti-MAYV em modelo animal. Outros autores também já relataram efetiva atividade antiviral da Silimarina *in vitro* contra o *Chikungunya virus* (CHIKV) (Lani et al., 2015). Além disso, a Silimarina apresentou atividade antiviral contra os vírus da HCV (Wagoner et al., 2010; Polyak; Ferenci; Pawlotsky, 2013; Liu et al., 2016) e HBV (Huang et al., 2017). Já a atividade antiviral da NAC foi demonstrada na literatura contra o *Dengue virus* (DENV) e o vírus da Influenza A (H5N1 e H3N2), através de estudos *in vitro* e *in vivo* (Sreekanth et. al., 2019; Ghezzi; Ungheri, 2004; Geiler et al., 2010).

O mecanismo de ação antiviral da Silimarina ainda não é bem elucidado na literatura, no entanto, alguns estudos demonstram como esse mecanismo poderia ocorrer. Um estudo recente publicado por nosso grupo de estudos demonstrou que a Silimarina apresenta efeito virucida e de inibição da penetração e adsorção do ZIKV em células Vero (Silva et al., 2020). Outro estudo demonstra que a Silimarina tem efeitos antivirais contra o vírus da hepatite C (HCV), inibindo a entrada do vírus, expressão de RNA e proteína e produção de partículas infecciosas, diminuindo a transmissão do vírus de célula para célula (Wagoner et al., 2010).

Após obtenção desses resultados *in vivo*, em que Silimarina e NAC exibiram efeito antioxidante e antiviral no fígado dos animais infectados pelo ZIKV, nós levantamos a hipótese de que as ERO produzidas após a infecção poderiam de alguma forma contribuir positivamente para a multiplicação do ZIKV; sendo assim, qualquer composto capaz de inibir ou detoxificar essas ERO poderia inibir a

multiplicação do ZIKV. O efeito das ERO na multiplicação dos vírus de maneira geral ainda é controverso, sendo que para alguns vírus a produção exacerbada dessas espécies parecer conter a infecção viral, enquanto que para outros vírus, o efeito parecer ser o contrário; ainda, essa relação ERO X multiplicação viral parece depender não só da espécie de vírus, mas do tipo celular infectado (Camini et al., 2017).

Para testar essa hipótese, células Vero foram infectadas com o ZIKV e tratadas com diferentes antioxidantes: Silimarina, NAC, Quercetina e Rutina. Nos tempos de 15 e 24 hpi, a produção de ERO foi medida e nos tempos de 24 e 48 hpi, a produção de vírus nessas células foi mensurada. Todos os compostos aqui testados foram capazes de diminuir a produção de ERO após a infecção de células Vero pelo ZIKV, 15 e 24 horas pós-infecção (hpi), confirmando seus efeitos antioxidantes. No entanto, apenas a Silimarina apresentou atividade antiviral contra o ZIKV, 24 e 48 hpi, como já havia sido mostrado por estudos prévios do grupo (Silva et al., 2020), enquanto os demais compostos, incluindo a NAC, não inibiram significativamente a produção de vírus nessas células.

A Quercetina e a Rutina são flavonóides e um dos antioxidantes mais estudados na literatura (Hartman; Shankel, 1990). Os flavonóides podem possuir ação antioxidante quando inativam radicais livres. Essas substâncias inibem as reações provocadas pelos radicais livres doando átomos de hidrogênio (Lima; Bezerra, 2012).

Segundo Zandi e colaboradores (2011) a Quercetina e Rutina podem inibir o DENV, outro membro da família *Flaviviridae* (a mesma família do ZIKV) (Zandi et al. 2011). Ainda, a Quercetina possui um efeito benéfico em pacientes com complicações graves de influenza A (H1N1) (Uchide; Toyoda, 2011) e estudos recentes demonstraram que a Quercetina e seus derivados naturais possuem atividade antiviral contra os vírus Chikungunya, Mayaro, Influenza, Ebola, Hepatite C, Epstein-Barr e hepatite B (Chaabi, 2020; Santos et al., 2014; Rojas et al., 2016; Qiu et al., 2016; Cheng et al., 2015). Por outro lado, a Rutina não apresentou atividade antiviral contra MAYV (Waleska et al., 2020).

Contudo, um derivado natural da Quercetina, a Quercetina-3- $\beta$ -O-D-glucosídeo (Q3G), exibiu efeitos anti-ZIKV em células Vero *in vitro*. Além disso, nesse estudo a Q3G apresentou uma ação antiviral em cultura de tecidos de camundongos

*knockout* para interferon do tipo I (Wong et al., 2017). Ainda, a Rutina em concentração de 100µM inibiu em mais de 40% as atividades da protease NS2B-NS3 do ZIKV, essencial para a replicação do vírus, produzidas em *E. coli* BL21 (DE3) (Lim et al., 2016).

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho *in vitro*, somente a Silimarina apresentou uma ação antiviral contra ZIKV, enquanto os outros compostos apresentaram somente ação antioxidante. Dessa forma, é possível inferir que a atividade antioxidante dos compostos provavelmente não está diretamente ligada à atividade antiviral contra o ZIKV, ou seja, talvez a produção de ERO não seja um fator tão significativo para a multiplicação do ZIKV, como ocorre com outros agentes virais (Pillai et al., 2019; Gullberg et al., 2015). Porém, mais estudos são necessários para a comprovação dessa hipótese e melhor estabelecer a ação anti-Zika para os compostos NAC, Quercetina e Rutina.

Uma vez que o ZIKV ainda é um Problema de Saúde nacional, com a presença de quadros clínicos debilitantes, e ainda há a ausência de tratamento específico, estudos que busquem elucidar a patogênese desse vírus e a procura por fármacos antivirais são essenciais. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o tratamento com a Silimarina e o NAC foram promissores no restabelecimento dos parâmetros redox no fígado de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV. Além disso, a Silimarina e o NAC apresentaram atividade antiviral, reduzindo a carga viral no fígado desses camundongos. Dessa forma, os resultados demonstram o potencial do efeito antiviral e antioxidante da Silimarina na infecção pelo ZIKV e abrem perspectivas do seu uso como abordagem farmacológica. Já o tratamento com a NAC, além de restabelecer os parâmetros redox no fígado dos animais infectados, foi capaz de diminuir multiplicação do ZIKV, chamando atenção por seu possível efeito anti-ZIKV *in vivo*. Os resultados *in vitro* indicam que só a inibição de ERO não parece ser suficiente para inibir a multiplicação do ZIKV. No entanto, mais estudos são importantes para melhor entender o papel das ERO, do estresse oxidativo e dos antioxidantes naturais na infecção pelo ZIKV e melhor estabelecer a ação anti-Zika para os compostos NAC, Quercetina e Rutina.

## REFERÊNCIAS

Afans'ev, J. B.; Dorozhko, A. J.; Brodskill, A. V.; Kostyuk, V. A.; Patapovitch, A. I., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v. 38, p. 1763-1769, 1989. DOI: 10.1016/0006-2952(89)90410-3

Agarwal, C.; Tyagi, A.; Kaur, M.; Agarwal, R. Silibinin inhibits constitutive activation of Stat3, and causes caspase activation and apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. **Carcinogenesis**, v.28, p.1463–70, 2007. DOI: 10.1093/carcin/bgm042.

Alfieri, M. A.; Leung, F. Y.; Grace, D. M. Selenium and zinc levels in surgical patients receiving total parenteral nutrition. **Biological Trace Element Research**, v.61, n.1, p.33-39, 1998. DOI: 10.1007/BF02784038

Almeida, L. T. et al. Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo. **Virus Research**, v. 286, 198084, 2020. DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198084.

Almeida, Letícia Trindade. **Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em células HepG2 infectadas pelo Caraparu vírus (Bunyaviridae)**. 2016. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

Amara-Mokrane, Y.A., Lehucher-Michel, M.P., Balansard, G., Duménil, G., Botta, A. Protective effects of a-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis**, Oxford, v.11, n.2, p.161-167, 1996. DOI: 10.1093/mutage/11.2.161

Amniattalab, A.; Malekinejad, H.; Rezabakhsh, A.; Rokhsartalab-Azar, S.; Alizade-Fanalou, S. Silymarin: a novel natural agent to restore defective pancreatic beta cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 15, n. 3, p. 493–500.

Andrade Junior, D.R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, n.1, p.60-68, 2005. DOI: 10.1590/S1806-37132005000100011.

Arboviroses – Dengue, Chikungunya, Zika e Febre Amarela. **Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, 2019.** Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/suvisa/vigilancia-epidemiologica/doencas-de-transmissao-vetorial/arboviroses-dengue-chikungunya-zika-e-febre-amarela/>> Acesso em 30 de Ago de 2021.

Bachmetov, L.; Gal-Tanamy, M.; Shapira, A.; Vorobeychik, M.; Giterman-Galam, T.; Sathiyamoorthy, P.; Golan-Goldhirsh, A.; Benhar, I.; Tur-Kaspa, R.; Zemel, R. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. **Journal of viral hepatitis**, v. 19, n.2, p. 81–88, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2011.01507.x

Baghel, Satyendra; Shrivastava, Nikhil; Baghel, PA; Rajput, Sarlesh. (2012). A review of quercetin: Antioxidant and anticancer properties. **World J Pharm Pharmaceutical Sci**, v.1, n.1, p. 146 - 160.

Barreiro E.; Puig-Vilanova E.; Marin-Corral J.; Chacón-Cabrera A.; Salazar-Degracia A.; Mateu X.; Puente-Maestu L.; García-Arumí E.; Andreu A.L.; Molina L. Therapeutic Approaches in Mitochondrial Dysfunction, Proteolysis, and Structural Alterations of Diaphragm and Gastrocnemius in Rats With Chronic Heart Failure. **Journal of cellular physiology**, v. 231 n. 7: 1495-513, 2016. DOI: 10.1002/jcp.25241.

Barreiro, E.; Puig-Vilanova, E.; Marin-Corral, J.; Chacón-Cabrera, A.; Salazar-Degracia, A.; Mateu, X.; Puente-Maestu, L.; García-Arumí, E.; Andreu, A.L.; Molina, L. Therapeutic Approaches in Mitochondrial Dysfunction, Proteolysis, and Structural Alterations of Diaphragm and Gastrocnemius in Rats With Chronic Heart Failure. **J Cell Physiol**, v. 231, n 7, p. 1495-513, 2016. DOI: 10.1002/jcp.25241.

Batista, P. M.; Andreotti R.; Almeida P.S.; Marques A.C.; Rodrigues S.G.; Chiang J.O. et al. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 6, p. 684-90, 2013. DOI: 10.1590/0037-8682-0181-2013

Bayir, A.; Kara, H.; Köylü, O.; Kocabas, R.; Ak, A. The effects of ubi-quinone (CoQ10) on heart tissue in cardiac toxicity related to organophosphate poisoning. **Human & experimental toxicology**, v. 32, p. 45–52. DOI: 10.1177/0960327112455070

Bernard, F.X.; Sable, S.; Cameron, B.; Provost, J.; Desnottes, J.F.; Crouzet, J.F.; Blanche, F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 992–998, 1997. DOI: 10.1128/AAC.41.5.992

Bianchi, M.L.P.; Antunes, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição** [online], v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999. DOI: 10.1590/S1415-52731999000200001

Bijak, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.) **Chemistry, Bioavailability, and Metabolism**, v. 22, 11 1942, 2017. DOI: 10.3390/molecules22111942

Bischoff, S. C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, n. 6, p. 733-740, 2008. DOI: 10.1097/MCO.0b013e32831394b8

Blitvich, B.J.; Firth, A.E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1927-59, 2015. DOI: 10.3390/v7041927.

Brasil, J.P. et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. **The New England journal of medicine.**, v. 375, p. 2321-2334, 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1602412

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 10, 2021. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 10, 2021. Disponível em:<[https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/marco/23/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_10.pdf](https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/marco/23/boletim_epidemiologico_svs_10.pdf)> Acesso em 14 de Out. 2021.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 3, 2021. Disponível em:<[https://www.gov.br/saude/ptbr/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_3.pdf](https://www.gov.br/saude/ptbr/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf)> Acesso em 14 de Out. 2021.

Camini, F. C. et al. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. **Archives of Virology**, v. 162, n. 4, p. 907–917, 2017a. DOI: 10.1007/s00705-016-3187-y

Camini, F. C. et al. Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus Research**, v. 236, n. November 2016, p. 1–8, 2017b. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.04.017

Camini, F.C.; da Silva T.F.; da Silva Caetano C.C.; et al. Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. **Antiviral Research**. v. 158, p. 8-12, 2018. DOI: 10.1016/j.antiviral.2018.07.023.

Çanakçı, C.F. & Çanakçı, V. Reactive Oxygen Species and Human Inflammatory Periodontal Diseases. **Biochemistry**, v. 70, p.619-28, 2005. DOI: 10.1007/s10541-005-0161-9.

Capasso, F.; Gaginella, T.S.; Grandolini, G.; Izzo, A.A. Phytotherapy, a quick reference to herbal medicine. **Springer Verlag**, 2003. ISBN: 3540000526.

Cardona-Cardona, A.F.; Rodríguez Morales, A.J. Severe abdominal pain in a patient with Zika infection: A case in Risaralda, Colombia. **J Infect Public Health**, v. 9, n. 3,

p. 372-3, 2016. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.03.001.

Carod-Artal, F.J. Epidemiology and neurological complications of infection by the Zika virus: a new emerging neurotropic virus. **Revista de Neurologia**, v. 62, n. 7, p. 317-328, 2016.

Casseb, A.; Casseb, L.; Silva, S.; Vasconcelos, P. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. **Vet. Zootec**, v. 20, p. 9-21, 2013.

Chaabi M. Antiviral effects of quercetin and related compounds. **Naturopathic Currents, Special Edition**, April 2020, Antiviral effects of quercetin and related compounds. Disponível em: <[https://naturopathiccurrents.com/sites/default/files/AntiviralEffectsofQuercetinandRelatedCompounds\\_0.pdf](https://naturopathiccurrents.com/sites/default/files/AntiviralEffectsofQuercetinandRelatedCompounds_0.pdf)> Acesso em 7 set de 2021.

Chen, H.; Miao, Q.; Geng, M.; Liu, J.; Hu, Y.; Tian, L.; Pan, J.; Yang, Y. Anti-tumor effect of rutin on human neuroblastoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. **Scientific World Journal**, 2013. DOI: 10.1155/2013/269165

Chen, S. et al. Innate immune evasion mediated by flaviviridae non-structural proteins. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 1–19, 2017. DOI: 10.3390/v9100291

Cheng, Z.; Sun, G.; Guo, W. *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication by quercetin in human hepatoma cell lines. **Viol. Sin.** v. 30, p. 261–268, 2015. DOI: 10.1007/s12250-015-3584-5

Choi, G.N.; Kim, J.H.; Kwak, J.H.; Jeong, C.H.; Jeong, H.R.; Lee, U.; Heo, H.J. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2. p. 1019- 1024, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.089

Choi, J.; Ou, J.H. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 290, p. G847-G851, 2006. DOI: 10.1152/ajpgi.00522.2005

Chtourou Y, Fetoui H, Sefi M, Trabelsi K, Barkallah M, Boudawara T. et al. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. **Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 23, n. 6, p. 985–996, 2010. DOI: 10.1007/s10534-010-9345-x

Clayton, W.; Winkler, Lara M.; Myers, Tyson A.; Woods, Ronald J.; Messer, Aaron B.; Carmody, Kristin L.; McNally; Dana P. Scott; Kim J. Hasenkrug; Sonja M. Best; Karin E. Peterson. Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. **The Journal of**

**Immunology**, v. 198 n. 9, p. 3526-3535, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1601949

Cleton, N.; Koopmans, M.; Reimerink, J.; Godeke, G.J.; Reusken, C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol**, v. 55, n. 3, p.:191-203, 201. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.07.004.

Coaccioli, S.; Crapa, G.; Fantera, M. et al. Oxidant/antioxidant status in patients with chronic HIV infection. **La Clinica Terapeutica**, v. 161, p. 55-58, 2010.

Comhair, S.A.A.; Erzurum, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.283, p.L246-L255, 2002. DOI: 10.1152/ajplung.00491.2001.

**Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB)**. Distribuição espacial de taxa de detecção de dengue, Zika e chikungunya por biologia molecular, Brasil, SE 1 a 52, 2019.

Costatini, D. Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. **The Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 13, p. jeb194688, 2019. DOI: 10.1242/jeb.194688

Da Silva Caetano, C. 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. 1–11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-51713-9.

Da Silva, R.R.; de Oliveira, T.T.; Nagem, T.J.; Pinto, A.S.; Albino, L. F.; de Almeida, M.R.; de Moraes, G.H.; Pinto, J.G. Hypocholesterolemic effect of naringin and rutin flavonoids. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 51, n. 3, p. 258–264, 2001.

Decker, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v.55, n.11, p.396-407, 1997. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1997.tb01580.x

Deep, G.; Agarwal, R. Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. **Integrative cancer therapies**, v. 6, n. 2, p. 130-45, 2007. DOI:10.1177/1534735407301441

Dhanwani, R. et al. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SHSY5Y cells: Role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus Research**, v. 163, n. 2, p. 563–572, 2012. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.12.009

Di, Meo F.; Lemaur, V.; Cornil, J.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.L.; Olivier, Y; et al. Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. **The journal of physical chemistry**, v. 117, n. 10, p. 2082–92. DOI: 10.1021/jp3116319

Dick, G. W. A. Zika virus II. Pathogenecity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 521–534, 1952.

DOI: 10.1016/0035-9203(52)90043-6

Dick, G. W. A.; Kitchen, S. F.; Haddow, A. J. ZIKA VIRUS (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, 1952. DOI: 10.1016/0035-9203(52)90042-4

Ding, T. et al. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. **J Pharm Biomed Anal**, v. 26, n.1, p. 155-161, 2001. DOI: 10.1016/s0731-7085(01)00364-8.

Donalisio, M. R.; Freitas, A. R. R.; Zuben, A. P. B. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, p. 10– 15, 2017. DOI: 10.1590/S1518-8787.2017051006889

Dröge, W.; Eck, H. P.; Mihm, S. Oxidant-antioxidant status in human immunodeficiency virus infection. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 594–601, 1994. DOI: 10.1016/s0076-6879(94)33062-x

Duffy, M.R.; Chen, T. H.; Hancock, W. T.; Powers, A. M.; Kool, J. L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; Guillaumot, L.; Griggs, A.; Bel, M.; Lambert, A.J.; Laven, J.; Kosoy, O.; Panella, A.; Biggerstaff, B.J.; Fischer, M.; Hayes, E.B. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England journal of medicine**, v. 360, p. 2536–2543, 2009. DOI: 10.1056/NEJMoa0805715. 23.

Eickmann, S. H. et al. Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cadernos de Saúde Pública** [online], v. 32, n. 7, e00047716, 2016. DOI: 10.1590/0102-311X00047716

El-Ebiary, A.A.; Elsharkawy, R.E.; Soliman, N.A.; Soliman, M.A.; Hashem, A.A. N-acetylcysteine in Acute Organophosphorus Pesticide Poisoning: A Randomized, Clinical Trial. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 119, n. 2, p. 222-7. DOI: 10.1111/bcpt.12554.

El-Marasy, S.A.; Abd-Elsalam, R.M.; Ahmed-farid, O.A. Ameliorative effect of Silymarin on Scopolamine-induced Dementia in rats. **Open Access Maced J Med Sci** v. 6, p. 1215–24, 2018. DOI: 10.3889/oamjms.2018.257

El-Sayed, N.M.; Fathy, G.M.; Abdel-Rahman, S.; El-Shafei, M.A. Cytokine patterns in experimental schistosomiasis mansoni infected mice treated with silymarin. **Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 922-9, 2016. DOI:10.1007/s12639-014-0606-4

Fallahzadeh, M.K.; Dormanesh, B.; Sagheb, M.M.; Roozbeh, J.; Vessal, G.; Pakfetrat, M.; et al. Effect of addition of silymarin to renin-angiotensin system inhibitors on proteinuria in type 2 diabetic patients with overt nephropathy: a randomized, double-

blind, placebo-controlled trial. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 60, n. 6, p. 896–903, 2012. DOI: 10.1053/j.ajkd.2012.06.005

Fan, D.; Zhou, X.; Zhao, C.; Chen, H.; Zhao, Y.; Gong, X. Anti-inflammatory, antiviral and quantitative study of quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronide in *Polygonum perfoliatum* L. **Fitoterapia**. v. 82, n. 6, p. 805-10, 2011. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.04.007.

Faridnia, R.; Kalani, H.; Fakhar, M.; Akhtari, J. Investigating in vitro anti-leishmanial effects of silibinin and silymarin on *Leishmania major*. **Annals of parasitology**, v. 64, n.1, p. 29–35, 2018. DOI:10.17420/ap6401.129

Féher, J.; Lengye, G. Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. **Current pharmaceutical biotechnology** v. 13, n. 1, p. 210-7, 2012. DOI:10.2174/138920112798868818

Fernandes, A.A.; Novelli, E.L.; Okoshi, K.; Okoshi, M.P.; Di Muzio, B.P.; Guimaraes, J.F.; Fernandes Junior, A. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 64, n. 3, p. 214–219, 2010. DOI:10.1016/j.biopha.2009.08.007

Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997. DOI: 10.1590/ S0104-42301997000100014.

Ferro, Camila de Oliveira et al. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, pp. 31-38, 2010. DOI: 10.1590/S0100-69912010000100008.

Figueiredo, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007. DOI: 10.1590/S0037-86822007000200016

Figueiredo, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect**, v. 2, n.13, p.1643-9, 2000. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01320-4

Flausino, R.F.; Souza-Santos, R.,; Oliveira, R.M. Indicadores socioambientais para vigilância da dengue em nível local. **Saúde e Sociedade**, v. 20, p. 225-40, 2011.

Flora, Swaran. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2. p. 191-206, 2009. DOI: 10.4161/oxim.2.4.9112.

Foy, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011. DOI:

10.3201/eid1705.101939

Fraschini, F.; Demartini, G.; Esposti, D. Pharmacology of Silymarin. **Clin. Drug Investig**, v. n. 22, p. 51–65, 2002. DOI: 10.2165/00044011-200222010-00007

Ganeshpurkar; Saluja. The Pharmacological Potential of Rutin. **Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 149-164, 2017. DOI: 10.1016/j.jsps.2016.04.025.

Garcez, M.; Bordin, D.; Peres, W.; Salvador, M. Radicais livres e espécies reativas. In SALVADOR, M. HENRIQUE, J.A.P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Ulbra, Canoas, p.13-33, 2004.

Geiler, J.; Michaelis, M.; Naczki, P.; et al. N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. **Biochemical pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 413–20, 2010. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.08.025

Geraets, L.; Moonen H.J.; Brauers, K.; Wouters, E. F.; Bast, A.; Hageman, G.J. Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2190–2195, 2007. DOI: 10.1093/jn/137.10.2190. PMID: 17884996.

Ghezzi, P; Ungheri, D. Synergistic combination of N-acetylcysteine and ribavirin to protect from lethal influenza viral infection in a mouse model. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 17, n. 1, p. 99-102, 2004. DOI: 10.1177/039463200401700114

Gil, L.; Martínez, G; Tápanes, R. et al. Oxidative stress in adult dengue patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, p. 652-657, 2004.

Golenbock, D. T. et al. Lipid al-like molecule that antagonize the effects of endotoxin on human monocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v 266, p. 19490-19498, 1991.

Gonçalves, C.F.; Santos, M.C.; Ginabreda, M.G.; Fortunato, R.S.; Carvalho, D.P.; Freitas Ferreira, A.C. Flavonoid rutin increases thyroid iodide uptake in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 9, e73908, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0073908

Gould, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, n. April, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1016/j.onehlt.2017.06.001

Gracy, R. W., Talent, J. M., Kong, Y., and Conrad, C. C. **Mutat. Res.**, 428, 1722, 1999.

Griffiths, E.; Halestrap, A. P. **J. Biochem.**, 307, 9398, 1995.

Gubler, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Ann N Y Acad Sci**, v.;951, n. 1,

p. 13-24, 2001. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x

Gubler, D. J. The Global Emergence / Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 330–342, 2002. DOI: 10.1016/s0188-4409(02)00378-8

Gutiérrez-Bugallo, G.; Piedra, L.A.; Rodriguez, M. et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature ecology & evolution**, v. 3, p. 561–569, 2019. DOI: 10.1038/s41559-019-0836-z

Há, H.L.; Shin, H.J.; Feitelson, M.A.; Yu, D.Y. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. **World J Gastroenterol**, v. 16, p. 6035-6043, 2010. DOI:10.3748/wjg.v16.i48.6035

Haddow, A.; Guzman H.; Popov V. et al. First isolation of Aedes flavivirus in the Western Hemisphere and evidence of vertical transmission in the mosquito Aedes (Stegomyia) albopictus (Diptera: Culicidae). **Virology**, v. 440. n. 2. P. 134- 139, 2013. DOI: 10.1016/J.VIROL.2012.12.008

Haleagrahara, N.; Siew, C.J.; Ponnusamy, K. Effect of quercetin and desferrioxamine on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced neurotoxicity in striatum of rats. **The Journal of toxicological sciences**, v. 38, n. 1, p. 25–33. DOI: 10.2131/jts.38.25.

Halliwell, B.; Cross, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ. Health.Perspect.**, v. 102 Suppl, n. 2, p. 5–12, 1994. DOI:10.1289/ehp.94102s105

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 136– 147, 2000. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. Free radical in biology an medicine. **New York: Oxford University**, p.189- 276, 1999.

Han, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by Candida albicans. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.11.002

Harborne, J.B. Nature, distribution and function of plantflavonoids. **Progress in clinical and biological research**, v. 213, p.15–24, 1986.

Henning, K.J. What is syndromic surveillance? **New York City Department of Health and Mental Hygiene**, v. 53, p.7–11, 2004

Hertog, M.G.; Hollman, P.C.; Katan, M.B.; Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands.

**Nutrition and cancer**, v. 20, n.1, p. 21–29, 1993. DOI: 10.1080/01635589309514267.

Hollman, P. C. H.; Hertog, M. G. L.; Katak, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 57. n. 1, p. 43-46, 1996. DOI:10.1016/0308-8146(96)00065-9

Hugh, J.W.; Bart,C.J.; Pieter, A.V.D. Guillain-Barré syndrome: a systematic review. **Lancet (London, England)**, v. 388, p. 717–727, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00339-1

Ibrahim, A.K.; Youssef, A.I.; Arafa, A.S.; Ahmed, S.A. AntiH5N1 virus flavonoids from Capparis sinaica Veill. **Natural product research**, v. 27, n. 22, p. 2149–2153, 2013. DOI:10.1080/14786419.2013.790027

Javed, H.; Khan, M.M.; Ahmad, A.; Vaibhav, K.; Ahmad, M.E.; Khan, A.; Ashafaq, M.; Islam, F.; Siddiqui, M.S.; Safhi, M.M.;Islam, F. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, v. 17, p. 340–352, 2012.DOI: 0.1016/j.neuroscience.2012.02.046

Jeong, J.H.; An, J.Y.; Kwon, Y.T.; Rhee, J.G.; Lee, Y.J. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. **Journal of cellular biochemistry**, v.106, n.1, p. 73–82, 2009. DOI: 10.1002/jcb.21977

Johansson, M. A.; Mier-y-Teran-Romero, L.; Reefhuis, J.; Gilboa, S. M.; Hills, S. L. Zika and the risk of microcephaly. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, p. 1–4, 2016. DOI: 10.1056/NEJMp1605367

Jones, D. P. Redefining Oxidative Stress. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 8, p. 1–16, 2006. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1865

Joubert, P.E.; Werneke, S.W.; de la Calle, C.et al. Chikungunya virus–induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 5, p. 1029-47, 2012. DOI:10.1084/jem.20110996

Kanashiro, A.; Andrade, D.C.; Kabeya, L.M.; Turato, W.M.; Faccioli, L.H.; Uyemura, S.A.; Lucisano-Valim, Y.M.Modulatory effects of rutin on biochemical and hematological parameters in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n.1, p. 67–72, 2009. DOI: 10.1590/S0001-37652009000100009

Karimi, G.; Vahabzadeh, M.; Lari, P.; Rashedinia, M.; Moshiri, M. “Silymarin”, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 14, p. 308–17, 2011.

Kasperczyk, S.; Dobrakowski, M.; Kasperczyk, A.; Ostalowska, A.; Birkner, E. The

administration of N-acetylcysteine reduces oxidative stress and regulates glutathione metabolism in the blood cells of workers exposed to lead. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 51, n. 6, p. 480-6, 2013. DOI: 10.3109/15563650.2013.802797.

Kelly, G.S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v. 3, p. 114–127, 1998.

Khan, M.M., Ahmad, A., Ishrat, T., Khuwaja, G., Srivastawa, P., Khan, M.B., Raza, S.S., Javed, H., Vaibhav, K., Khan, A., Islam, F., 2009. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. **Brain research**, v. 1292: 123-35, 2009. DOI:10.1016/j.brainres.2009.07.026

Khorsandi, L.; Saki G.; Bavarsad, N.; Mombeini, M. Silymarin induces a multi-targeted cell death process in the human colon cancer cell line HT-29. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 94, p. 890-897, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.015

Kim, D.W.; Hwang, I.K.; Lim, S.S.; Yoo, K.Y.; Li, H.; Kim, Y.S.; Kwon, D.Y.; Moon, W.K.; Kim, D.W.; Won, M.H. Germinated Buckwheat extract decreases blood pressure and nitrotyrosine immunoreactivity in aortic endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. **Phytotherapy research**, v. 23, n. 7, p. 993–998, 2009. DOI: 10.1002/ptr.2739

Kittur, S.; Wilasrusmee, S.; Pedersen, W.A.; Mattson, M.P.; Straube-West, K. Wilasrusmee C.; et al. Neurotrophic and neuroprotective effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on neurons in culture. **Journal of molecular neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 265–269, 2002. DOI:10.1385/jmn:18:3:265

Klase et al., 2016. Zika fetal neuropathogenesis: etiology of a viral syndrome. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, Article e0004877, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004877

Klassen, P. et al. Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. **Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 542–547, 2004. DOI: 10.1016/j.nut.2004.03.016

Knekt, P.; Isotupa, S.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Järvinen, R.; Häkkinen, S.; Aromaa, A.; Reunanen, A. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. **European journal of clinical nutrition**, v. 54, n. 5, p. 415–417, 2000. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1600974

Knekt, P.; Järvinen, R.; Seppänen, R.; Heliövaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American journal of epidemiology**, v. 146, n. 3, p. 223-30, 1997. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009257.

Koujan, S.E.; Gargaria, B.P.; Mobasser, M.; Valizadeh, H.; Asghari-Jafarabadi M. Lower glycemic indices and lipid profile among type 2 diabetes mellitus patients who

received novel dose of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) extract supplement: a Triple-blinded randomized controlled clinical trial. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v.44, p. 39–44, 2018. DOI:10.1016/j.phymed.2018.03.050

Kreft, S., Knapp, M., Kreft, I., 1997. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4649–4652, 1999. DOI: 10.1021/jf990186p

Kroll D.J.; Shaw H.S.; Oberlies N.H. Milk Thistle Nomenclature: Why It Matters in Cancer Research and Pharmacokinetic Studies. **Integrative Cancer Therapies**. 2007:110-119. DOI:10.1177/1534735407301825

Kudchodkar, S. B. et al. Rapid response to an emerging infectious disease - Lessons learned from development of a synthetic DNA vaccine targeting Zika virus. **Microbes and Infection**, v. 20, p. 676–684, 2018. DOI: 10.1016/j.micinf.2018.03.001

Lalani, S.S.; Anasir, M.I.; Poh, C.L. Antiviral activity of silymarin in comparison with baicalein against EV-A71. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, 2020. DOI:10.1186/s12906-020-2880-2

Lanciotti, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008. DOI: 10.3201/eid1408.080287

Lani, R.; Hassandarvish, P.; Chiam, C. *et al.* Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Sci Rep**, v. 5, 11421, 2015. DOI: 10.1038/srep11421

Lara, P. F.; Oliveira-Filho, R. M. Evolução farmacológica dos mucolíticos. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v.3, n.2, 1999. Disponível em: <[http://arquivosdeorl.org.br/conteudo/pdfForl/1999\\_0302\\_05.pdf](http://arquivosdeorl.org.br/conteudo/pdfForl/1999_0302_05.pdf)>. Acesso 25 de ago de 2021.

Lee, W.M. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. **Hepatology**, v. 40, p. 6–9, 2004. DOI: 10.1002/hep.20293

Li, S., Armstrong, N., Zhao, H., Hou, W., Liu, J., Chen, C., Wan, J., Wang, W., Zhong, C., Liu, C., Zhu, H., Xia, N., Cheng, T., Tang, Q. Zika virus fatally infects wild type neonatal mice and replicates in central nervous system. **Viruses**, v.10, n.1, 2018. DOI: 10.3390/v10010049

Lima, F.; Sobreira, A.; Bezerra, A. FLAVONOIDES E RADICAIS LIVRES FLAVONOIDS AND FREE RADICALS,. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria**, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.

Lin, J.P.; Yang, J.S.; Lin, J.J.; Lai, K.C.; Lu, H.F.; Ma, C.Y.; SaiChuen Wu, R.; Wu, K.C., Chueh, F.S.; Gibson Wood, W.; Chung, J.G. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. **Environmental toxicology**, v. 27, n. 8, p. 480–484, 2012. DOI: 10.1002/tox.20662

Lindenbach, B.D.; Thiel, H.; Rice, C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. **Fields virology. 5 th**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1101-52.

Lino, F.G. **Efeitos da silimarina e da silibina na patogênese da infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni***. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012

Liu C.; Lu X.Z.; Shen M.Z.; Xing C.Y.; Ma J.; Duan Y.Y.; Yuan L.J. N-Acetyl Cysteine improves the diabetic cardiac function: possible role of fibrosis inhibition. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 15:84, 2015. DOI: 10.1186/s12872-015-0076-3.

Lopes, N.; Nozawa, C.; Linhares, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua , v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014. Disponível em <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=pt&nrm=iso)>. acesso em 03 set. 2021.

Luper, S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v. 3, n. 6, p. 410-21, 1998.

Luz, K. G.; Santos, G. I. V. ; Vieira, R. M.. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** [online], v. 24, n. 4, pp. 785-788, 2015. DOI: 10.5123/S1679-49742015000400021

Maalik, Aneela; Khan, Farhan; Mumtaz, Amara; Mahmood, Adeem; Azhar, Saira; Atif, Muhammad; Karim, Sabiha; Altaf, Yasir; Tariq, Imran. Pharmacological Applications of Quercetin and Its Derivatives: A Short Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.13, n.9, p. 1561-1566, 2014. DOI: 10.4314/tjpr.v13i9.26.

Machado, D.G.; Bettio, L.E.; Cunha, M.P.; Santos, A.R.; Pizzolatti, M.G.; Brighente, I.M.; Rodrigues, A.L. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **European journal of pharmacology**, v. 587, n. 1–3, p. 163–168, 2008. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.03.021

Maciel, R. M.; Costa, M. M.; Martins, D. B.; França, R. T.; Schmatz, R.; Graça, D. L.; Duarte, M. M.; Danesi, C. C.; Mazzanti, C. M.; Schetinger, M. R.; Paim, F. C.; Palma,

H. E.; Abdala, F. H.; Stefanello, N.; Zimpel, C. K.; Felin, D. V.; Lopes, S. T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 2, p. 389–397, 2013. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.04.028

Macnamara, F.N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145. DOI: 10.1016/0035-9203(54)90006-1

Magalhaes-Barbosa et al. Trends of the microcephaly and Zika virus outbreak in Brazil. *Travel medicine and infectious disease*, v. 14, n. 5, p. 458–463, 2016. DOI: 10.1016/j.tmaid.2016.09.006

Manach C; Williamson G; Morand C; Scalbert A; Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n.1 Suppl, p. 230S–242S, 2005. DOI: 10.1093/ajcn/81.1.230S.

Marchette, R.N.J.; Garcia, A. Rudnick. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 18, n. 3, p. 411-415, 1969. DOI: 10.4269/ajtmh.1969.18.41

Martínez de Salazar, P. et al. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, n. xx, p. 1–6, 2016. DOI: 10.1016/j.eimc.2016.02.016

Mastron, J.; Siveen K.; Sethi G.; Bishayee A. Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review. **AntiCancer Drugs**, v. 26, p. 475–86, 2015. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000211

Mata-Santos,H.A.; Lino, F.G.; Rocha, C.C.; Paiva, C.N.; Silymarin treatment reduces granuloma and hepatic fibrosis in experimental schistosomiasis. **Parasitology research**, v.107, n. 6, p. 1429-34, 2010. DOI:10.1007/s00436-010-2014-8

Maurya, A.K.; Vinayak, M. Modulation of PKC signaling and induction of apoptosis through suppression of reactive oxygen species and tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1): key role of quercetin in cancer prevention. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n.11, p. 8913–8924. DOI: 10.1007/s13277-015-3634-5

McClure, J. et al. Silibinin Inhibits HIV-1 Infection by Reducing Cellular Activation and Proliferation. **PLoSOne**,v. 7, n. 7, p. 1-9, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0041832.

Mlakar J.; Korva M.; Tul N.; Popovic M.; Poljsak-Prijatelj M.; Mraz J. et al. Zika virus associated with microcephaly. **N Engl J Med.**, v. 374, n. 10, p. 951–8, 2016. DOI:10.1056/NEJMoa1600651

Moretti, E.; Mazzi, L.; Terzuoli, G.; Bonechi, C.; Iacoponi, F.; Martini, S.; Rossi, C.; Collodel, G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 34, n. 4, p. 651–657. DOI: 10.1016/j.reprotox.2012.10.002.16.

Musso, D. et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, 2015. DOI: 10.3201/eid2102.141363

Musso, D., T. Nhan, E. Robin, C. Roche, D. Bierlaire, K. Zisou, A. Shan Yan, V.M. Cao-Lormeau, J. Brout. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill.**, v.19, p. 20761, 2014.

Musso, D., E.J. Nilles, V.M. Cao-Lormeau. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area Clin. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n.10, p. O595–O596. DOI: 10.1111/1469-0691.12707

Neufeldt, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.170

Nieoczym, D.; Socała, K.; Raszewski, G.; Wlaz´, P. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 54, p.50–58, 2014. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2014.05.007

Nijveldt, R.J; Van, Nood E.; Van, Hoorn D.E.; Boelens, P.G.; Van, Norren, K; Van, Leeuwen, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001. DOI: 10.1093/ajcn/74.4.418.

Nizer, W.; Ferraz, A.; Moraes, T.; Ferreira, F. L.; Magalhães, C.;Vieira-Filho, S.; Duarte, L.; Magalhães, J. Lack of Activity of Rutin Isolated from *Tontelea micrantha* Leaves Against Vero and BHK, Fungi, Bacteria and Mayaro Virus and its In Silico Activity. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v.11, n.1, p. 9-14, 2020. DOI: 11. 10.4103/jpnr.JPNR\_12\_19.

Nones, J.; Costa, A.P.; Leal, R.B.; Gomes, F.C.; Trentin, A.G. The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. **Cell and tissue research**, v. 350, n. 2, p. 305–315, 2012. DOI:10.1007/s00441-012-1472-y

Oliveira, V.A.; Oliveira, C.S.; Mesquita, M.; Pedroso, T.F.; Costa, L.M.; Fiuza, Tda L.; Pereira, M.E. Zinc and N-acetylcysteine modify mercury distribution and promote increase in hepatic metallothionein levels. **J Trace Elem Med Biol**, v. 32, p. 183-8, 2015. DOI: 10.1016/j.jtemb.2015.06.006

- Olszewer, E. **Radicaís livres em medicina**. São Paulo: BYK, 1995. 204p.
- Pandima, D.K.; Malar, D.S.; Braidy, N.; Nabavi, S.M.; Nabavi, S.F. A mini review on the chemistry and neuroprotective effects of silymarin. **Current drug targets**, v. 18, n. 13, p. 1529–1536, 2017. DOI: 10.2174/1389450117666161227125121
- Pathak, D.; Pathak, K.; Singla, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.
- Paula, H. L.; Bernasconi, T. L.G.; Carvalho, J. A. M. O estresse oxidativo na hepatite C. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria**, v. 18, n. 2, p. 353-361, 2017.
- Pedriali, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- Peterhans, E. Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 91, p. 383–392, 1979. DOI: 10.1016/0006-291x(79)90630-2
- Pillai, A. B. et al. Oxidative stress response in the pathogenesis of dengue virus virulence, disease prognosis and therapeutics : an update. **Archives of Virology**, v. 164, n. 12, p. 2895-2908, 2019. DOI: 10.1007/s00705-019-04406-7
- Pimentel, R.B.; da Costa, C.A.; Albuquerque, P.M.; Junior, S.D. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BMC Complement. BMC complementary and alternative medicine**, v. 13 151.1, 2013. DOI:10.1186/1472-6882-13-151
- Pinheiro, F.P.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Vasconcelos, P.F.C. Arboviroses. In: Veronesi R, Focaccia R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu; 1996. p.169-80.
- Polyak, S.J.; Oberlies N.H.; Pécheur E.I.; Dahari H.; Ferenci P.; Pawlotsky JM. Silymarin for HCV Infection. **Antivir Ther**, v. 18, n. 2, p. 141–7, 2013. DOI: 10.3851/IMP2402
- Pool-Zobel, B. L.; Bub, A.; Müller, H.; Wollowski, I.; Rechkemmer, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, New York, v.18, n.9, p.1847-1850, 1997. DOI: 10.1093/carcin/18.9.1847
- Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção

pelo vírus Zika. **Secretária de vigilância em saúde**, versão 1.2, 2015. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/09/Microcefalia---Protocolo-de-vigil--ncia-e-resposta---vers--o-1----09dez2015-8h.pdf>>. Acesso em 1 Set de 2021.

Qiu X.; Kroeker A.; He S. et al. Prophylactic Efficacy of Quercetin 3-β-O-d-Glucoside against Ebola Virus Infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5182–5188, 2016. DOI: 10.1128/AAC.00307-16

Rahman, I. et al. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v.533, n.1-3, p.222-239, 2006. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.12.087.

Ramasamy, K.; Agarwal, R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 352-62, 2008. DOI:10.1016/j.canlet.2008.03.0532008;269:352–62.

Rambaldi, A.; Jacobs, B.P.; Laquinto, G.; Gluud, C. Milk thistle for alcoholic and/or hepatitis B or C liver diseases – a systematic Cochrane Hepato-Biliary group review with meta-analyses of randomized clinical trials. **The American journal of gastroenterology**, v. 100, n. 11, p. 2583-91, 2005. DOI:10.1111/j.1572-0241.2005.00262.x

Ramezani, Ali; Nahad, Mehdi; Faghihloo, Ebrahim. The role of Nrf2 transcription factor in viral infection. **Journal of cellular Biochemistry**, v. 22, n. March, p. 1–17, 2018. DOI: 10.1002/jcb.26897

Rojas, Á.; Del Campo, J.; Clement, S. *et al.* Effect of Quercetin on Hepatitis C Virus Life Cycle: From Viral to Host Targets. **Sci Rep**, v. 6, 31777, 2016. DOI: 10.1038/srep31777

Roos, D. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes infection**, v. 5, p. 1307-1315, 2003. DOI: 10.1016/j.micinf.2003.09.009

Rossi, S. L. et al. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1362–1369, 2016. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0111

Russo, M.; Spagnuolo, C.; Tedesco, I.; Bilotto, S.; Russo G.L. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 6–15, 2012. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.08.010.

Rust, R.S. Human arboviral encephalitis. **Semin Pediatr Neurol**, v. 19, n. 3, p. 130-51, 2012. DOI: 10.1016/j.spen.2012.03.002 [Link]

Santos, A.E.; Kuster, R.M.; Yamamoto, K.A. *et al.* Quercetin and quercetin 3-O-

glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity. **Parasites Vectors**, v. 7, 130, 2014. DOI: 10.1186/1756-3305-7-130

Santos, N.O.S.; Romanos, M.T.V.; Wigg, M.D. **Introdução à virologia humana. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008. 532 p.**

Schwartz, D. A. Autopsy and Postmortem Studies Are Concordant: Pathology of Zika Virus Infection Is Neurotropic in Fetuses and Infants With Microcephaly Following Transplacental Transmission. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 141, n. 1, p. 68–72, 2017. DOI:10.5858/arpa.2016-0343-AO

Seet R.C.; Lee C.Y.; Lim E.C. et al. (2009). Oxidative damage in dengue fever. **Free radical biology & medicine** v. 47, n. 4, p. 375-80, 2009. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.035

Sejvar, J. J.; Baughman, A. L.; Wise, M.; Morgan, O. W. Population incidence of Guillain-Barré syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Neuroepidemiology**, v. 36, n. 2, p. 123-33, 2011. DOI: 10.1159/000324710

Shackelford, R. E.; Kaufmann, W. K.; Paules, R. S. **Free Rad. Biol. Med.**, 28, 13871404, 2000.

Shadnia, S.; Ashrafivand, S.; Mostafalou, S.; Abdollahi, M. N-acetyl-cysteine a novel treatment for acute human organophosphate poi-soning. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 732–5, 2011. DOI: 10.3923/ijp.2011.732.735.

Sherman, K.E.; Rouster, S.D.; Kong, L.X.; Aliota, M.T.; Blackard, J.T.; Dean, G.E. Zika virus replication and cytopathic effects in liver cells. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, e0214016, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0214016

Shirley, D. A. T.; Nataro, J. P. Zika Virus Infection. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, n. 4, p. 937–951, 2017. DOI: 10.1016/j.pcl.2017.03.012

Silva, A. A.; Gonçalves, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, pp. 994-1002. DOI: 10.1590/S0103-84782010005000037

Silva, Herculano da. **Migração de leucócitos para o sistema nervoso central na infecção experimental por vírus ZIKV**. 2018. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. DOI:10.11606/D.17.2019.tde-01022019-095421.

Simmonds, P.; Becher, P.; Bukh, J.; Gould, E. A.; Meyers, G.; Monath, T.; Muerhoff, S.; Pletnev, A.; Rico-Hesse, R.; Smith, D. B.; Stapleton, J. T.; Ictv Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **The Journal of general virology**, v. 98, n.1, p. 2–3. DOI: 10.1099/jgv.0.000672

Sklar, G.E.; Subramaniam M. Acetylcysteine treatment for non-acetaminophen-induced acute liver failure. **The Annals of pharmacotherapy**; v. 38, p. 498–500, 2004. DOI: 10.1345/aph.1D209

Song, B.; Yun, S.; Woolley, M.; Lee, Y. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50-64. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.001.

Song, J.; Choi, H. Silymarin efficacy against influenza A virus replication. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 18, p. 832-5, 2011. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.01.026.

Song, J.H.; Shim, J.K.; Choi, H.J. Quercetin 7-rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral induced reactive oxygen species. **Virology journal**, v. 8, n. 460, 2011. DOI:10.1186/1743-422X-8-460

Song, Z.; Deaciuc, I.; Song, M.; Lee, D.Y.-W.; Liu, Y.; Ji, X.; McClain, C. Silymarin Protects Against Acute Ethanol-Induced Hepatotoxicity in Mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, p. 407-413, 2006. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2006.00063.x

Sonnenbichler, J. et al. Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells. **Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, v. 290, n. 3, p. 1375-1383, 1999.

Souza- Silva, J.; Ariano, Z. DE F.; Scopel, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle - THE DENGUE FEVER IN BRAZIL AND COMBAT DENGUE FEVER TO THE AEDES AEGYPTI: OF THE TRY ERADICATION TO CONTROL POLICIES. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 4, n. 6, 25 jun. 2008.

Sreekanth, G.P.; Panaampon, J.; Suttitheptumrong, A.; Chuncharunee, A.; Bootkunha, J.; Yenchitsomanus, P.T.; Limjindaporn, T. Drug repurposing of N-acetyl cysteine as antiviral against dengue virus infection. **Antiviral Research**, v. 166, p. 42-55, 2019. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.03.011..

Srinivasan, K.; Kaul, C.L.; Ramarao, P. Partial protective effect of rutin on multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 327–328, 2005. DOI:10.4103/0253-7613.16859

Taleb, A.; Ahmad, K.A.; Ihsan, A.U.; Qu, J.; Lin, N.; Hezam, K.; et al. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 102, p. 689–698, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.140

Tao, J.; Hu, Q.; Yang, J.; Li, R.; Li, X.; Lu, C.; Chen, C.; Wang, L.; Shattock, R.; Ben,

K. In vitro anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. **Antiviral Research**, v. 75, n. 3, p. 227–233, 2007. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.03.008

Tehrani, H.; Halvaie, Z.; Shadnia, S.; Soltaninejad, K.; Abdollahi, M. Protective effects of N-acetylcysteine on aluminum phosphide-induced oxidative stress in acute human poisoning. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 51, n. 1, p. 23-8. DOI: 10.3109/15563650.2012.743029.

Teskey, G.; Abrahem, R.; Cao, R; et al. Glutathione as a Marker for Human Disease. **Adv Clin Chem**, v.87, p. 141–159, 2018. DOI:10.1016/bs.acc.2018.07.004

Tongjaroenbuangam, W.; Ruksee, N.; Chantiratikul, P.; Pakdeenarong, N.; Kongbuntad, W.; Govitrapong, P. Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. **Neurochemistry international**, v. 59, p. 677–685, 2011. DOI: 10.1016/j.neuint.2011.06.014.

Traber, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, v.23, n.3/6, p.135-139, 1997.

Travassos da Rosa, A.P.A.; Travassos da Rosa, J.F.S.; Pinheiro, F.P.; Vasconcelos, P.F.C. Arboviroses. In: Leão RNQ. Doenças infecciosas e parasitárias – enfoque amazônico. Belém: CEJUP; UEPA; **Instituto Evandro Chagas**, p.207-25, 1997.

Tuorkey, M.J.; El-Desouki, N.L.; Kamel, R.A. Cytoprotective effect of silymarin against diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. **Biomedical and environmental sciences: BES**, v. 28, n.1, p. 36–43, 2015. DOI: 10.3967/bes2015.004

Turgut, F.; Bayrak, O.; Catal, F.; Bayrak, R.; Atmaca, A.F.,; Koc, A; et al. Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissues of rats. **International urology and nephrology**, v. 40, n. 2, p. 453-60, 2008. doi:10.1007/s11255-008-9365-4

Tyagi, A.; Raina K.; Singh, R.P.; Gu, M.; Agarwal, C.; Harrison, G.; et al. Chemopreventive effects of silymarin and silibinin on N-butyl-N-(4- hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, p. 3248-55, 2007. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2006.

Ullah, H.; Khan, H. Anti-parkinson potential of silymarin: mechanistic insight and therapeutic standing. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 422, 2018. DOI:10.3389/fphar.2018.00422

Valko, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-

84, 2007. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

Vasanthi, R.; ShriShriMal, H.N.; Das, D.K. Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease. **Current medicinal chemistry**, v.19, n.14, p. 2242–2251, 2012. DOI:10.2174/092986712800229078

Vasconcelos P.F.C.; Travassos da Rosa A.P.A.; Pinheiro F.P; Shope R.E.; Travassos da Rosa J.F.S.; Rodrigues S. G. et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: **Instituto Evandro Chagas**; p.72-99, 1998.

Wagoner, J.; Negash, A.; Kane, O.J.; Martinez, L.E.; Nahmias, Y.; Bourne, N.; Owen, D.M.; Grove, J.; Brimacombe, C.; McKeating, J.A.; Pécheur, E.-I.; Graf, T.N.; Oberlies, N.H.; Lohmann, V.; Cao, F.; Tavis, J.E.; Polyak, S.J. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. **Hepatology**, v. 51, p.1912-1921, 2010. DOI: 10.1002/hep.23587

Waldorf, K.M.; Adams, J.E.; Stencel-Baerenwald, R.P.; Kapur, C.; Studholme, E.; Boldenow, J. ; Vornhagen, A.; Baldessari, M.K.; Dighe, J.; Thiel, S.; Merillat, S. et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. **Nature medicine**, v. 22, n.11, p.1256–1259, 2016. DOI: 10.1038/nm.4193

Wang, L.; Wang, B.; Li, H.; Lu, H.; Qiu, F.; Xiong, L.; Xu, Y.; Wang, G.; Liu, X.; Wu, H.; Jing, H. Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice. **European journal of pharmacology**, v. 690, n. 1-3, p. 133–141, 2012. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.06.018.

Waters, M. D.; Stack, H. F.; Jackson, M. A.; Brockman, H. E.; De Flora, S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.109-129, 1996. DOI: 10.1016/0027-5107(95)00097-6

Weinbren, M.C; Williams. Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, p. 263–268. DOI: 10.1016/0035-9203(58)90085-3

Won, D.H.; Kim, L.H.; Jang, B.; Yang, I.H.; Kwon, H.J.; Jin, B.; et al. In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. **Tumor Biology**, v. 40, p. 1 -11, 2018. DOI:10.1177/1010428318776170

Wong, S. S.; Poon, R. W.; Wong, S. C. Zika virus infection-the next wave after dengue? **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, n. 4, p. 226–242, 2016. DOI: 10.1016/j.jfma.2016.02.002

Yu, J. et al. Effective Suckling C57BL/6, Kunming, and BALB/c Mouse Models with

Remarkable Neurological Manifestation for Zika Virus Infection. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 165, 2017. DOI: 10.3390/v9070165

Zaidi, S.N.F.; Mahboob, T. Prevention of liver cirrhosis by Silymarin. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v.30 p.1203–1, 2017.

Zandi K.; Teoh B.T.; Sam S.S. et al. In vitro antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against dengue virus type-2. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 5534–5539, 2011. DOI: 10.5897/JMPR11.1046.

Zhang, P.; Liu, B.; Kang, S. W.; Seo, M. S.; Rhee, S. G.; Obeid, L. M. **J. Biol. Chem.**, 272, 30615–30618, 1997.

Zhang, Y.; Wang, Z.; Chen, H.; et al. Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 24, p. 30–36, 2014. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.02.011

*Zika Virus*. **ViralZone Swiss Institute of bioinformatics**, 2016. Disponível em: <[https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species)> Acesso em 29 de Ago de 20121

Zunec, S.; Kopjar, N.; Zeljezic, D.; Kuca, K.; Musilek, K.; Lucic, Vrdoljak A. In vivo evaluation of cholinesterase activity, oxidative stress markers, cyto- and genotoxicity of K048 oxime—a promising anti-dote against organophosphate poisoning. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 114, p. 344–51, 2014. DOI: 10.1111/bcpt.12158

Zwingmann, C.; Bilodeau, M. Metabolic insights into the hepatoprotective role of N-acetylcysteine in mouse liver. **Hepatology**, v. 43, p. 454–463, 2006. DOI: 10.1002/hep.21075

## ANEXOS

## Anexo I: Certificado de Aprovação do estudo pela Comissão de Ética no Uso Animal



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da susceptibilidade de camundongos C57BL/6 à infecção pelo Zika virus e da atividade antiviral, antioxidante e hepatoprotetora da silimarina em camundongos infectados", protocolada sob o CEUA nº 4154170919 (ID 000259), sob a responsabilidade de **Cintia Lopes de Brito Magalhães e equipe; Ariane Coelho Ferraz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 18/10/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the susceptibility of C57BL/ 6 mice to Zika virus infection and the antiviral, antioxidant and hepatoprotective activity of silymarin in infected mice.", utilizing 168 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 4154170919 (ID 000259), under the responsibility of **Cintia Lopes de Brito Magalhães and team; Ariane Coelho Ferraz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 10/18/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2019](#) a [07/2021](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [19 a 21 dias](#)

N: [168](#)

Peso: [12 a 14 g](#)

Local do experimento: Centro de Ciência Animal

Ouro Preto, 24 de outubro de 2019

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Ouro Preto

Anexo II: Artigos original publicado no ano de 2019 (co-autora) em 2019  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51713-9>

## scientific reports

[Explore content](#) ▾ [About the journal](#) ▾ [Publish with us](#) ▾

[nature](#) > [scientific reports](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open Access](#) | Published: 25 October 2019

### Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress is Associated With Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model

Camila Carla da Silva Caetano, Fernanda Caetano Camini, Letícia Trindade Almeida, Ariane Coelho Ferraz, Tales Fernando da Silva, Rafaela Lameira Souza Lima, Mayara Medeiros de Freitas Carvalho, Thalles de Freitas Castro, Cláudia Martins Carneiro, Breno de Mello Silva, Silvana de Queiroz Silva, José Carlos de Magalhães & Cintia Lopes de Brito Magalhães 

Anexo III: Artigos original publicado no ano de 2020 (co-autora)  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105613>



Acta Tropica

Volume 211, November 2020, 105613



### Antiviral effect of silymarin against Zika virus *in vitro*

Tales Fernando da Silva <sup>a</sup>, Ariane Coelho Ferraz <sup>a</sup>, Letícia Trindade Almeida <sup>a</sup>, Camila Carla da Silva Caetano <sup>a</sup>, Fernanda Caetano Camini <sup>a</sup>, Rafaela Lameira Souza Lima <sup>a</sup>, Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade <sup>a</sup>, Danilo Bretas de Oliveira <sup>c</sup>, Kamila Lorene Soares Rocha <sup>c</sup>, Breno de Mello Silva <sup>a, b</sup>, José Carlos de Magalhães <sup>d</sup>, Cintia Lopes de Brito Magalhães <sup>a, b</sup> 

Anexo IV: Artigos original publicado no ano de 2020 (co-autora)  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198084>



Virus Research  
Volume 286, September 2020, 198084



## Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities *in vitro* and *in vivo*

Letícia Trindade Almeida <sup>a</sup>, Ariane Coelho Ferraz <sup>a</sup>, Camila Carla da Silva Caetano <sup>a</sup>, Marília Bueno da Silva Menegatto <sup>a</sup>, Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade <sup>a</sup>, Rafaela Lameira Souza Lima <sup>a</sup>, Fernanda Caetano Camini <sup>a</sup>, Samille Henriques Pereira <sup>b</sup>, Karla Yanca da Silva Pereira <sup>c</sup>, Breno de Mello Silva <sup>a, b, c</sup>, Luiza Oliveira Perucci <sup>a, b, d</sup>, André Talvani <sup>c, d</sup>, José Carlos de Magalhães <sup>e</sup>, Cintia Lopes de Brito Magalhães <sup>a, c</sup> ✉

Anexo V: Artigos original publicado no ano de 2021 (co-autora)  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105168>



Antiviral Research  
Volume 194, October 2021, 105168



## Hepatoprotective, antioxidant, anti-inflammatory, and antiviral activities of silymarin against mayaro virus infection

Ariane Coelho Ferraz <sup>a</sup>, Letícia Trindade Almeida <sup>a</sup>, Camila Carla da Silva Caetano <sup>a</sup>, Marília Bueno da Silva Menegatto <sup>a</sup>, Rafaela Lameira Souza Lima <sup>a</sup>, Joao Pinto Nelson de Senna <sup>d</sup>, Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso <sup>a</sup>, Luiza Oliveira Perucci <sup>a, b, c</sup>, André Talvani <sup>a, c, d</sup>, Wanderson Geraldo de Lima <sup>a, d</sup>, Breno de Mello Silva <sup>a, b, c, d</sup>, Alexandre Barbosa Reis <sup>a, e</sup>, José Carlos de Magalhães <sup>f</sup>, Cintia Lopes de Brito Magalhães <sup>a, d</sup> ✉

