



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 MICRO-ORGANISMOS

**Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em  
macrófagos murinos após infecção pelo *Mayaro virus*  
(*Togaviridae*)**

**CAMILA CARLA DA SILVA CAETANO**

**OURO PRETO  
2016**



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 MICRO-ORGANISMOS

**Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em  
macrófagos murinos após infecção pelo *Mayaro virus*  
(*Togaviridae*)**

**CAMILA CARLA DA SILVA CAETANO**

**ORIENTAÇÃO: PROF(A) 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 Metabólica e Fisiológica.

**OURO PRETO  
2016**

C128a Caetano, Camila Carla da Silva.  
Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em macrófagos murinos após infecção pelo Mayaro virus (Togaviridae) [manuscrito] / Camila Carla da Silva Caetano. - 2016.  
74f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Vírus. 2. Espécies Reativas de Oxigênio. 3. Antioxidantes. I. Magalhães, Cintia Lopes de Brito. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.152.1

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



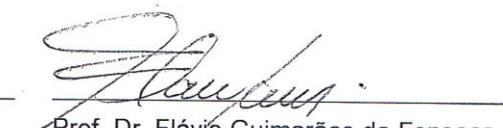
**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**

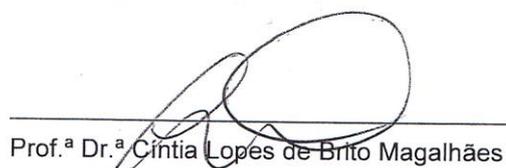
**"Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em macrófagos murinos após infecção pelo Mayaro Virus (Togaviridae)"**

Aos quatro dias do mês de março de 2016, às 13 horas e 30 minutos, no Auditório do ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Camila Carla da Silva Caetano. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Frank Silva Bezerra  
Examinador (UFOP)

  
Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca  
Examinador (UFMG)

  
Prof.ª Dr.ª Cíntia Lopes de Brito Magalhães  
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **04/03/2016**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS



NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto - Campus Universitário  
Monte do Godinho / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil - Tel.: (31) 3599-1681  
E-mail: [discipl@nupeb.ufop.br](mailto:discipl@nupeb.ufop.br) / [www.nupeb.ufop.br/chiol/](http://www.nupeb.ufop.br/chiol/)

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Madalena e Caetano, pelo amor e apoio incondicionais!*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

À professora **Cintia Lopes de Brito Magalhães**, pela perfeição em orientar e pelos ensinamentos, dedicação e profissionalismo no qual realiza seu trabalho.

Obrigada pela oportunidade e pela confiança em mim depositada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, presença constante em todas as etapas da minha vida. A meus pais, Madalena e Caetano, principais responsáveis por todas as minhas conquistas.

A todos meus familiares e amigos, especialmente meus irmãos Marina e Henrique, minha avó Tereza (*in memoriam*) por me ensinar a nobreza da humildade, avô Mateus (*in memoriam*) e avó Conceição pelo exemplo de vida.

À minha prima e amiga Fernanda, pelos ensinamentos, ajuda e força desde o início do mestrado. À Carolina, Daiana e Amanda, pela ótima convivência e amizade e à Tales pelo carinho e paciência. Vocês foram o diferencial para tornar minha vida em Ouro Preto inesquecível!

Aos colegas da pós-graduação, à Letícia pelo companheirismo essencial durante todo o mestrado. À Carini e Vinícius, por contribuírem para a realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos pela ótima convivência e troca de conhecimentos: José, Paola, Érica, Ana Cláudia, Cyntia, Célia, Ingridy, Marina, Ivon, Mariana e aos professores Silvana, Breno e Maria Célia.

À Universidade Federal de Ouro Preto e aos professores colaboradores.

A todos os funcionários e professores da UFOP/ICEB/NUPEB que, de alguma forma, possibilitaram a realização desse trabalho.

## RESUMO

O *Mayaro virus* (MAYV) é membro da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. Em humanos, o MAYV causa a Febre Mayaro, doença que apresenta sintomas parecidos com a dengue e outras arboviroses, com exceção das artralgias e artrites persistentes, que são sintomas característicos da infecção pelos *Alphavirus*. Embora a Febre Mayaro seja importante em termos de saúde pública, os mecanismos que contribuem para a sua patogênese ainda são pouco elucidados. Neste contexto, trabalhos da literatura têm demonstrado que o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese de muitos vírus. O estresse oxidativo é um estado de desregulação da sinalização e do controle redox, onde ocorre um desequilíbrio entre a produção de "Espécies Reactivas de Oxigênio" (EROs) e ação do sistema de defesa antioxidante, levando a danos celulares. Os principais antioxidantes enzimáticos são a Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT), e entre os não-enzimáticos, a Glutathione (GSH). Assim, uma vez que são poucos os trabalhos na literatura pautando a patogênese do MAYV e que o estresse oxidativo pode ser fator chave no estabelecimento/progressão de uma variedade de doenças virais, a proposta desse trabalho foi investigar o envolvimento do estresse oxidativo na infecção pelo MAYV, e se esse evento está relacionado à produção exacerbada de EROs e/ou a alteração nas defesas antioxidantes. Para tal, macrófagos foram utilizados desde que são importantes células envolvidas no estabelecimento da artrite induzida por alfavírus. Macrófagos murinos J774 foram infectados com uma multiplicidade de infecção (moi) de 5 e em diferentes horas pós infecção (hpi) foram avaliados parâmetros oxidantes e antioxidantes nas células. A infecção aumentou a produção de EROs, a atividade da SOD e expressão das enzimas SOD e CAT, mas reduziu o conteúdo de Glutathione total. Níveis aumentados de Malondialdeído (MDA), um biomarcador de peroxidação lipídica, foram encontrados em células infectadas com o MAYV. Ainda, em células infectadas, a expressão do RNAm da citocina Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) aumentou nos tempos iniciais após a infecção. Seguida a maior indução de TNF- $\alpha$ , observamos também em células infectadas pelo MAYV um aumento na expressão gênica da Metaloproteinase de Matriz 3 (MMP-3), cujo papel no dano articular já foi observado na infecção por outros alfavírus. Juntos, nossos resultados sugerem que uma alteração no *status* redox após infecção pelo MAYV leva as células ao estresse oxidativo e seus efeitos deletérios para a células hospedeiras. Estes resultados apontam para novas abordagens na compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da infecção pelo MAYV.

**ABSTRACT**

Mayaro virus (MAYV) is a member of the family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*. In human beings, the MAYV causes the Mayaro Fever, disease that presents symptoms similar to the dengue and others arboviruses, with an exception of the persistent arthralgia and arthritis, which are characteristic symptoms of the infection caused by the *Alphavirus*. Although the Mayaro Fever is more important in terms of public health, the mechanisms that contribute of the pathogenesis are still unknown. In this context, studies have shown that oxidative stress may contribute to the pathogenesis of many virus. The oxidative stress is a state of deregulation of the redox signaling and control, where there is an imbalance between the production of "reactive oxygen species" (ROS) and action of the antioxidant defense systems, leading to cellular damage. The main enzymatic antioxidant are the Superoxide Dismutase (SOD), and Catalase (CAT), and among the non-enzyme, the Glutathione (GSH). Therefore, there is little information regarding the pathogenic characteristics of MAYV, and considering that the oxidative stress may be a key factor in the establishment/progression of a variety of viral diseases, the purpose of this study was to examine the involvement of oxidative stress in infection by MAYV. We also analyzed if this event is related to the excessive production of ROS and/or changes in antioxidant defenses. Macrophages were used once that they are important cells involved in the establishment of the alphavirus-induced arthritis. The murine macrophages were infected with a multiplicity of infection (moi) of 5 and at different times post infection (pi) were evaluated parameters oxidants and antioxidants. The infection increased the production of ROS, the activity of SOD and expression of SOD and CAT, but decreased the content of total glutathione. In cells infected with MAYV, were found elevated levels of Malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipid peroxidation. In addition, in infected cells, the expression of mRNA of cytokine Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) increased in the inicial hours pi. We also observed in infected cells by MAYV an increased in the gene expression that matrix metalloproteinase 3 (MMP-3), which role in the articular damage has been already observed in the infection by others *Alphavirus*. Our results suggest that an alteration in the redox status after the infection by MAYV leads the cells to the oxidative stress and its effects deleterious for the host cells. These results show new approaches in the comprehension of mechanisms involved in the pathogenesis of the infection by the MAYV.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AR** – Artrite Reumatoide  
**ASFV** – *African swine fever virus*  
**BSO** – Butionina Sulfoximina  
**CAT** – Catalase  
**CARV** – Vírus Caraparu  
**CHIKV** – Vírus Chikungunya  
**CMC** – Carboximetilcelulose  
**DENV** – Vírus da Dengue  
**DMEM** – Meio Dulbecco's Modified Eagle  
**DMSO** – Sulfóxido de Dimetilo  
**DNA** – Àcido desoxirribonucleico  
**ECP** – Efeito Citopático  
**EEEV** – Vírus da Encefalite Equina Oriental  
**ERO** – Espécie Reativa de Oxigênio  
**GAPDH** - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
**GCS** – $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase  
**GPx** – Glutaciona Peroxidase  
**GR** – Glutaciona Redutase  
**GSSG** – Glutaciona Oxidada  
**GSH** – Glutaciona reduzida  
**GSH-Px** – Glutaciona peroxidase  
**G6PDH** – Glicose-6-fosfato desidrogenase  
**HBV** – Vírus da Hepatite B  
**HCV** – Vírus da Hepatite C  
**HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana  
**Hpi** – Horas pós-infecção  
**HTLV-1** – Vírus Linfotrópico Humano de Células T  
**INF** – Interferon

**IL** – Interleucina  
**IgM** – Imunoglobulina M  
**JEV** – Vírus da Encefalite Japonesa  
**LACV**–Vírus La Crosse  
**MAYV** – Vírus Mayaro  
**MCP-1** – Proteína Quimiotática de Monócitos-1  
**MDA** – Malondialdeído  
**MEC** – matriz extracelular  
**MIF** – Fator de Inibição da Migração de Macrófagos  
**MMP** - Metaloproteinase  
**MOI** – Multiplicidade de Infecção  
**MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina  
**NAD** - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina  
**NADPH** - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Fosfato  
**NO** – Óxido Nítrico  
**ONNV** – Vírus *O'nyong nyong*  
**ORF** – *Open Reading Frame*  
**OROV** – Vírus Oropouche  
**PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase  
**RdRp** – RNA polimerase RNA dependente  
**RNA** – Àcido ribonucléico  
**ROCV** – Vírus Rocio  
**RRV** – Vírus Ross River  
**RSV** – Vírus Respiratório Sincicial  
**RV** – Vírus *Rubella*  
**RVFV** – Vírus da Febre do Vale do Rift  
**SFB** – Soro Fetal Bovino  
**SINV** – Vírus Sindbis  
**SLEV** – Vírus da Encefalite de St. Louis  
**SLV** – Vírus *Semliki Forest*  
**SOD** – Superóxido Dismutase  
**TBARS** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

- TBHP** – Hidroperóxido tert-butil
- TIMP** – Inibidor Endógeno de Mataloproteinase
- TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral Alfa
- UFP** – Unidade Formadora de Placa
- VEEV** – Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
- YFV** – Vírus da Febre Amarela
- ZIKV** – Vírus Zika
- WEEV** – Vírus da Encefalite Equina Ocidental
- WHO** – Organização Mundial de Saúde
- WNV** – Vírus West Nile

**LISTA DE TABELAS**

Tabela I: Arbovírus emergentes e reemergentes no Brasil e doenças relacionadas .....	5
Tabela II: Principais <i>Alphavirus</i> no mundo associados com doenças humanas.....	9
Tabela III: Algumas espécies reativas e suas meias-vidas .....	18
Tabela IV: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores .....	35

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico dos arbovírus. ....	4
<b>Figura 2:</b> Representação da organização genômica do MAYV. ....	7
<b>Figura 3:</b> Estrutura dos <i>Alphavirus</i> .....	8
<b>Figura 4:</b> Distribuição do MAYV nas Américas.....	12
<b>Figura 5:</b> Ciclo de transmissão do MAYV.....	14
<b>Figura 6:</b> Prevalência do envolvimento de articulações na infecção pelo MAYV.....	16
<b>Figura 7:</b> Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes. ....	26
<b>Figura 8:</b> Curva de multiplicação do MAYV em células J774.....	39
<b>Figura 9:</b> MAYV induz a produção de EROs em células J774.....	42
<b>Figura 10:</b> MAYV aumenta a atividade da enzima Superóxido Dismutase em células J774.....	43
<b>Figura 11:</b> MAYV altera a expressão do RNAm de SOD1 e CAT em células J774.....	44
<b>Figura 12:</b> MAYV altera o conteúdo de Glutathiona Total em células J774.....	45
<b>Figura 13:</b> MAYV induz estresse oxidativo em células J774.....	46
<b>Figura 14:</b> MAYV altera a expressão do RNAm de TNF- $\alpha$ e MMP-3 em células J774.....	48

**SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>SUMÁRIO</b> .....	xv
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1- Arbovírus .....	3
2.2- Família Togaviridae, gênero Alphavirus .....	6
2.3- Artrite induzida por <i>Alphavirus</i> .....	10
2.4- Mayaro virus (MAYV).....	12
2.5- Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Estresse Oxidativo.....	18
2.6- Defesas Antioxidantes .....	21
2.7- Estresse Oxidativo e Infecções por Vírus.....	26
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	30
3.1- Objetivo Geral .....	30
3.2- Objetivos Específicos .....	30
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1- Multiplicação do MAYV .....	31
4.2- Titulação do MAYV .....	31
4.3- Curva de multiplicação do MAYV em células J774 .....	32
4.4- Dosagem de EROs.....	32
4.5- Dosagem da atividade total de SOD.....	33
4.6- Expressão do RNAm de SOD1, CAT, GAPDH, TNF- $\alpha$ e MMP-3 .....	34
4.6.1- Extração do RNA total e síntese do cDNA (RT-PCR).....	34
4.6.2- PCR em tempo real (qPCR).....	35
4.7- Dosagem de Glutathiona Total .....	36

4.8- Dosagem de Malondialdeído .....	37
4.9- Análise Estatística .....	38
<b>5- RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1- Curva de multiplicação do MAYV em células J774 .....	39
5.2- Avaliação da produção de EROs .....	41
5.3- Avaliação das enzimas antioxidantes SOD e CAT .....	42
5.3.1- Atividade total de SOD .....	42
5.3.2- Expressão do RNAm de SOD-1 e CAT .....	43
5.4- Avaliação de Glutathiona total .....	45
5.5- Análise do biomarcador de estresse oxidativo Malondialdeído .....	46
5.6- Avaliação da expressão gênica de TNF- $\alpha$ e MMP-3.....	47
<b>6- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>57</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>73</b>

## 1- INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as doenças virais emergentes e reemergentes, aquelas recentemente identificadas na população humana ou já existentes, mas que rapidamente aumentaram sua incidência e ampliaram sua distribuição geográfica, tornaram-se cada vez mais preocupantes em relação à saúde pública, especialmente aquelas relacionadas aos arbovírus (States *et al.*, 2001). Os arbovírus estão globalmente distribuídos e são responsáveis por milhões de casos de doenças em humanos a cada ano, sendo considerados portanto, de grande importância em termos de saúde pública (Fassbinder-Orth *et al.*, 2014).

No Brasil, destacam-se vários importantes arbovírus, como o *Dengue virus* (DENV), *Yellow Fever virus* (YFV), *Oropouche virus* (OROV), *Mayaro virus* (MAYV) e, recentemente, *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Zika virus* (ZIKV), que são globalmente distribuídos e responsáveis por milhões de casos de doenças humanas a cada ano (Fassbinder-Orth *et al.*, 2014; Figueiredo, 2015; Calvet *et al.*, 2016), sendo consideradas portanto, de grande importância em termos de saúde pública (Napoleão-Pego, *et al.*, 2014; Serra *et al.*, 2016).

Em humanos, o MAYV causa a Febre Mayaro, doença com amplo espectro de sintomas. Na maioria dos casos ocorrem poliartalgias, artrites, febre, cefaleia, mialgia, náuseas, vômitos, diarreia, erupção cutânea e dor ocular, com duração de cerca de 3 a 5 dias. Não há casos de morte pela febre Mayaro, entretanto pode causar doença incapacitante, uma vez que as artalgias e artrites podem durar cerca de meses e até anos, sendo alguns pacientes hospitalizados (Mourão *et al.*, 2012; Assunção-Miranda *et al.*, 2013).

O MAYV foi isolado pela primeira vez em 1954 no sangue de trabalhadores rurais febris, próximo à cidade de Mayaro (por isso o nome do vírus), em Trinidad e Tobago. Desde então, surtos e pequenas epidemias dessa infecção foram relatados também na Guiana Francesa, Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela, Colômbia e Argentina. No Brasil, o MAYV foi isolado pela primeira vez em 1955 durante um surto em uma comunidade rural próximo à cidade de Belém, no estado do Pará. Desde então, o MAYV se mantém endêmico nessa região (Figueiredo & Figueiredo, 2014).

Desde seu primeiro isolamento em Trinidad e Tobago, o MAYV era tido como circunscrito apenas à América do Sul, em mamíferos silvestres ou comunidades humanas ribeirinhas. No entanto, o número de casos humanos da febre Mayaro tem aumentado nos grandes centros urbanos, portanto, a maior incidência humana desse vírus já é patente (Mourão *et al.*, 2012). Em 2011, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) emitiu um alerta epidemiológico

devido a um surto da doença na Venezuela e ressaltou que a Febre Mayaro é endêmica na Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa e Suriname (OPAS, 2014).

No Brasil, a circulação do MAYV na região Norte é muito bem conhecida. Fora dos arredores da região Amazônica, pouco se sabe sobre a circulação desse vírus. Um estudo recente detectou casos de febre Mayaro no Estado de Mato Grosso, região Centro-oeste, em pacientes com diagnóstico clínico de febre do dengue (Vieira *et al.*, 2015). Esse achado mais uma vez chamou atenção para o caráter negligenciado dessa arbovirose. Estima-se que 1% de todas as doenças febris, com os mesmos sintomas da dengue, no norte da América do Sul sejam causadas, na verdade, pelo MAYV (Forshey *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2015).

Assim, diante da possibilidade de que esta arbovirose tenha potencial de emergir no Brasil, acredita-se que quaisquer medidas sejam menos onerosas e mais eficientes sob todos os aspectos, quanto mais cedo forem tomadas. Uma das preocupações dos virologistas é justamente a emergência de viroses ainda não devidamente caracterizadas, para as quais não se sabe exatamente a relevância, a patogenia, o tratamento e as formas de controle. Assim, esse trabalho busca elucidar importantes características frente à infecção pelo MAYV.

Diante das evidências crescentes de que o estresse oxidativo está relacionado com a patogênese de uma variedade de doenças virais, aliado ao fato de que são poucos os trabalhos na literatura pautando os *Alphavirus* no que diz respeito ao dano oxidativo, esse trabalho teve como objetivo investigar as características da infecção do MAYV, por meio da avaliação do efeito da infecção no perfil oxidativo e alteração das defesas antioxidantes. Para tal, as células utilizadas nesse estudo foram macrófagos, desde que estudos apontam o papel dessas células no desenvolvimento da artrite induzida por alfavírus.

Os resultados aqui obtidos nos mostram que a infecção de macrófagos J774 pelo MAYV causou um aumento no *status* pró-oxidante, observado pelo aumento na produção de EROs. Além disso, a infecção alterou a atividade da enzima antioxidante SOD e expressão das enzimas SOD e CAT, bem como o conteúdo intracelular de Glutathiona. Esse desequilíbrio no *status* oxidante/antioxidante celular pode ter contribuído para o estresse oxidativo, observado pelo aumento nos níveis de MDA, um biomarcador de peroxidação lipídica. Sugere-se então que, o estresse oxidativo induzido pelo MAYV pode contribuir para os efeitos deletérios para a célula durante a infecção e pode ser um importante componente na patogênese desse vírus.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

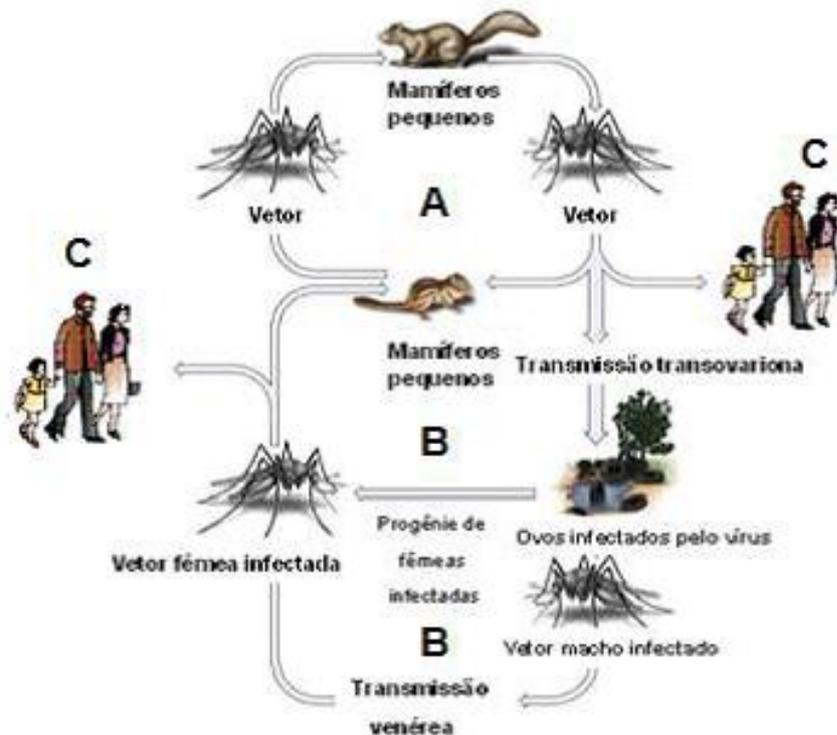
### 2.1- Arbovírus

A designação “arbovírus” origina-se da expressão inglesa “*arthropod-borne virus*” e é dada para os vírus que são transmitidos e mantidos na natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados susceptíveis. Os arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus, com mais de 500 membros registrados no “International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates” (<https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>). Ainda, possuem um genoma constituído por ácido ribonucleico (RNA), com exceção do *African swine fever virus* (ASFV), cujo genoma é ácido desoxirribonucleico (DNA). O genoma de RNA dos arbovírus pode ser segmentado ou não, e apresentar-se com uma ou mais fitas (Monath, 1988). Os arbovírus com genomas não segmentados pertencem às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae*, enquanto aqueles com genomas segmentados incluem-se nas famílias *Bunyaviridae* e *Reoviridae* (Beaty *et al.*, 1988).

A manutenção dos arbovírus na natureza ocorre em um ciclo silvestre complexo, envolvendo hospedeiros vertebrados, tais como pássaros, roedores, anfíbios, répteis e primatas não humanos, e vetores artrópodes hematófagos, tais como mosquitos, moscas, carrapatos, flebotomíneos (*Phlebotomus*, *Sergentomya* e *Lutzomya*), maruins ou mosquito pólvora (*Culicoides*), percevejos (*Oeciacus*) e possivelmente ácaros. Os vetores, depois de serem infectados, transmitem esses vírus ao se alimentarem do sangue dos hospedeiros vertebrados, especialmente aves e mamíferos roedores, que são os reservatórios mais importantes. O ciclo se fecha quando novos artrópodes são infectados ao se alimentarem do sangue de vertebrados que apresentam viremia. A transmissão vertical, através da via transovariana, e a transmissão venérea, também podem ocorrer (Figura 1). Normalmente, a infecção humana por arbovirus é considerada acidental, e ocorre quando a transmissão é entre vetor e o homem e não entre o vetor e seu hospedeiro vertebrado silvestre (Vasconcelos *et al.*, 2009; Forrester *et al.*, 2012).

Há milênios os arbovírus já infectavam humanos em todo o mundo, causando doenças. No entanto, com o passar dos anos, houve um aumento na sua distribuição geográfica devido principalmente à expansão da população humana e às suas atividades que aumentaram a

exposição à infecção (Weaver, 2013). Dentre as variáveis que contribuem para a ampliação das arboviroses no mundo, destacam-se as mudanças ambientais e ecológicas produzidas pelo homem, que podem aumentar a prevalência do vetor, criar novos reservatórios ou induzir os arbovírus a se adaptarem a novos ciclos de manutenção. Considera-se também pertinente o fato dos arbovírus serem capazes de viajar grandes distâncias e de entrarem em novos países ou continentes, o que aumenta seu potencial de causar pandemias (Figueiredo, 2007).



**Figura 1: Ciclo biológico dos arbovírus.** A – Ciclo de amplificação em mamíferos, no qual a fêmea infectada poderá transmitir o vírus a pequenos mamíferos que desenvolvem uma viremia alta e curta, podendo levar à infecção de novos artrópodes hematófagos. B – Ciclo reservatório, no qual ocorre a transmissão transovariana e venérea. C – Infecção humana acidental. Fonte: adaptado de <http://www.microbeworld.org>

Mais de 100 espécies de arbovírus no mundo possuem capacidade de provocar doença em humanos, sendo responsáveis por significativos problemas de saúde pública. Entre estes, a maioria são transmitidos por mosquitos, incluindo os *Flavivirus*, tais como o DENV, YFV, ZIKV, *Rocio virus* (ROCV), *West Nile virus* (WNV), *St. Louis encephalitis virus* (SLEV) e o *Japanese encephalitis virus* (JEV); os *Alphavirus*, que incluem: MAYV, CHIKV, *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV), *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), *Sindbis virus* (SINV) e *Ross River virus* (RRV); e os

*Orthobunyavirus*, incluindo o *La Crosse virus* (LACV) e *Oropouche virus* (OROV) (Kuno & Chang, 2005; Napoleão-Pego *et al.*, 2014).

O Brasil, por ser um país tropical, apresentar grande extensão territorial e possuir mais de 1/3 do território recoberto por florestas tropicais, apresenta condições ideais para a ocorrência de arboviroses, sendo, portanto, uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, não só devido às condições climáticas favoráveis, mas também à grande diversidade da fauna e flora, onde coabitam um elevado número de espécies de hematófagos (Figueiredo, 2007).

Desde a década de 50 do século passado até os dias atuais, mais de 210 espécies de arbovírus foram isoladas no Brasil, sendo que cerca de 40 causam doenças esporádicas, endêmicas e/ou epidêmicas em humanos, sendo responsáveis por morbidade e/ou mortalidade. Em conjunto, DENV, YFV, OROV, MAYV e ROCV foram responsáveis por mais de 95% dos casos humanos envolvendo arbovírus no Brasil (Figueiredo, 2007; Terzian *et al.*, 2011). Ainda, mais recentemente, os arbovírus CHIKV e ZIKV foram introduzidos no território nacional e têm causado importantes epidemias (<http://portalsaude.saude.gov.br/>). A Tabela I exhibe as principais arboviroses estudadas no Brasil nas últimas décadas e as respectivas doenças relacionadas.

**Tabela I:** Arbovírus emergentes e reemergentes no Brasil e doenças relacionadas

Família	Vírus	Sigla	Doença
<i>Flaviviridae</i>	Dengue	DENV	Doença febril e febre hemorrágica
	Encefalite de Saint Louis	SLEV	Meningite e encefalite
	Rocio	ROCV	Encefalite
	Oeste do Nilo	WNV	Meningite e encefalite
	Bussuquara	BUSV	Doença febril
<i>Togaviridae</i>	Mayaro	MAYV	Doença febril e artralgias
	Encefalite Equina do Leste	EEEV	Doença neurológica
	Chikungunya	CHIKV	Doença febril e artralgias
	Zika	ZIKV	Doença febril sistêmica
<i>Bunyaviridae</i>	Oropouche	OROV	Doença febril, febre hemorrágica, doença neurológica

**Fonte:** Adaptado Lopes *et al.*, 2014; Heukelbach *et al.*, 2016.

As formas clínicas das arboviroses em humanos variam conforme o tipo de vírus responsável pela infecção e também das condições biológicas do hospedeiro. A maioria

apresenta uma evolução benigna, porém alguns podem causar significativos quadros clínicos que podem culminar na morte ou incapacitação permanente do paciente (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Assim, as manifestações clínicas das arboviroses em humanos são divididas em quatro categorias: doença febril, febre exantemática, febre hemorrágica e encefalite. Outros sintomas como hepatite, broncopneumonia e conjuntivite também são relatados. A doença febril apresenta-se, geralmente, com sintomas semelhantes aos da gripe, tais como febre, dor de cabeça, dor retro-orbital e mialgia; a febre exantemática manifesta-se com exantema, poliartralgia e poliartrites; a febre hemorrágica pode apresentar-se clinicamente com petequias espontâneas ou sangramento persistente, uma baixa contagem de plaquetas, aumento das enzimas hepáticas, entre outros; o quadro de encefalite pode manifestar-se como mielite, meningite e/ou encefalite, com alterações comportamentais, paralisia, paresia, convulsões e problemas na coordenação (Pinheiro *et al.*, 1986; Zacks & Paessler, 2010; Suhrbier *et al.*, 2012).

O que determina cada uma das manifestações clínicas das arboviroses são fatores como inóculo, tempo de exposição, genótipo do vírus e fatores do hospedeiro, levando sempre em consideração que essas síndromes em grande parte, se sobrepõem, sendo necessário um diagnóstico baseado em todos os sintomas clínicos e não de um sintoma isolado. Um mesmo arbovírus pode causar diferentes sintomas e, por outro lado, a mesma sintomatologia pode ser causada por diferentes arbovírus (Gubler, 2002).

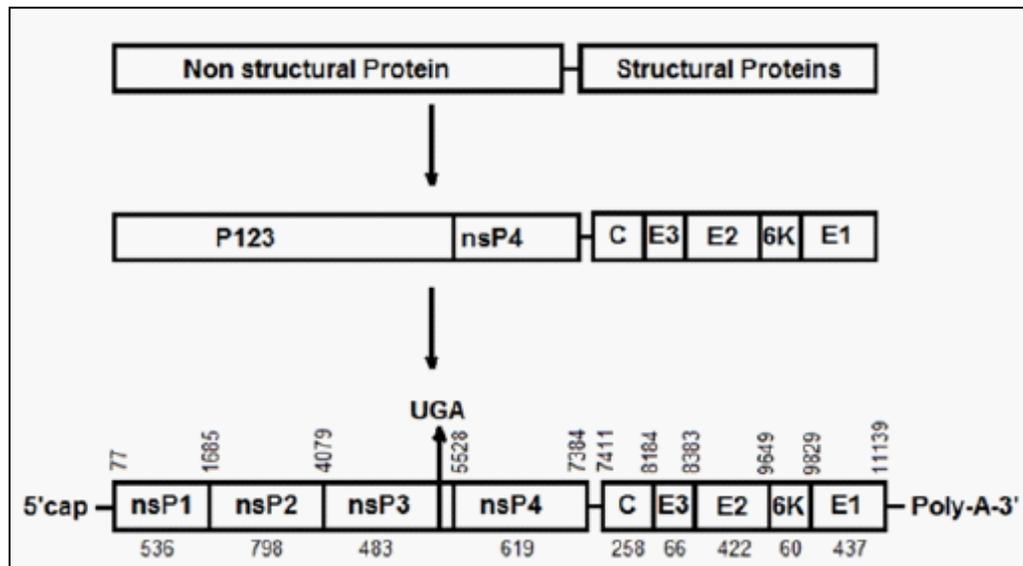
Dentre os arbovírus, destacam-se membros da família *Togaviridae*. As rápidas alterações no meio ambiente, com suas diversas implicações, têm tornado os vírus dessa família importantes agentes infecciosos emergentes e reemergentes. Algumas espécies que mais se destacam nesse cenário são: CHIKV, EEEV, RRV, SINV, WEEV, VEEV, MAYV, entre outros.

## 2.2- Família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*

A família *Togaviridae* é subdividida em dois gêneros: o gênero *Alphavirus*, que apresenta 31 espécies reconhecidas, e o gênero *Rubivirus*, que possui apenas 1 espécie (ICTV, 2015). Membros dessa família medem aproximadamente 70 nm de diâmetro e apresentam capsídeo de simetria icosaédrica, circundado por envoltório constituído de espículas que formam projeções em sua superfície. A organização do envelope viral contendo glicoproteínas de superfície está

intimamente envolvida com o reconhecimento e entrada do vírus na célula, e a depleção de colesterol do envelope compromete a estabilidade dessas partículas, reduzindo sua infecciosidade (Sousa *et al.*, 2011).

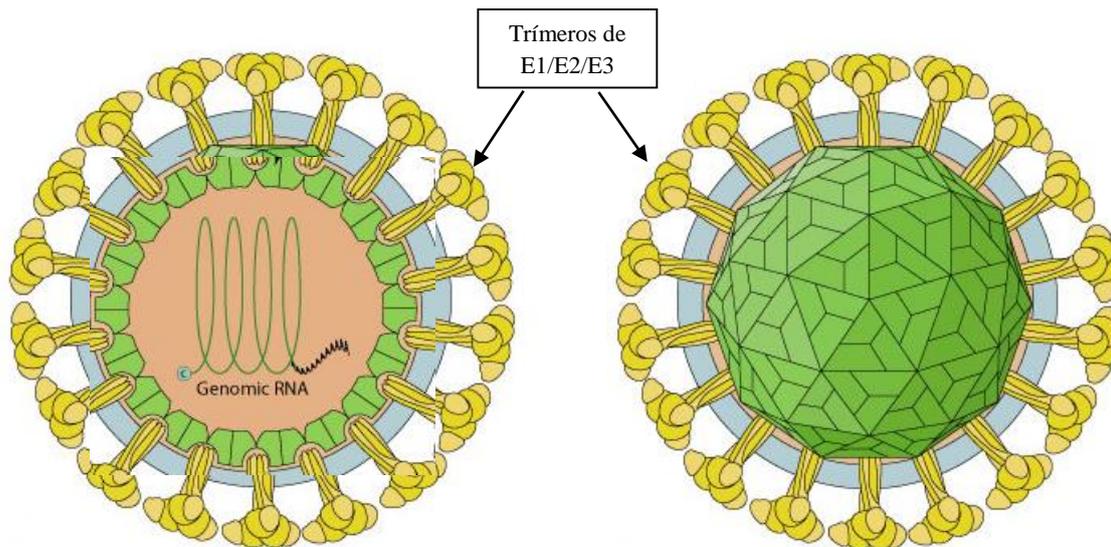
O genoma RNA dos vírus da família *Togaviridae* é linear, de polaridade positiva, com aproximadamente 12.000 nucleotídeos distribuídos por oito genes (Figura 2). Ainda, há uma calda de poliadenilato (Poli-A) na sua extremidade 3' e a extremidade 5' é flanqueada pelo resíduo 7-metilguanossina (cap5'). O RNA viral é estruturado em duas janelas de leitura aberta (ORFs), separadas por uma região intergênica altamente conservada. A primeira ORF abrange dois terços do RNA genômico, que pode ser lida diretamente como RNAm para codificar as quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) necessárias para a transcrição e replicação virais. A segunda região codifica as proteínas estruturais C (capsídeo), E3, E2, E1 e 6K, sob o controle de um RNA subgenômico classificado como 26S. O RNA 26S é transcrito a partir de um intermediário de cadeia negativa e é complementar ao RNA genômico, que depois de ser submetido a clivagem por enzimas e furinas, dá origem a proteínas E1, E2, E3 e 6k da proteína C estrutural do capsídeo (Kuhn, 2007; Napoleão-Pego *et al.*, 2014; Mota *et al.*, 2015).



**Figura 2:** Representação da organização genômica do MAYV. Fonte: Napoleão-Pego *et al.*, 2014.

Os *Alphavirus* são classificados com base em suas propriedades antigênicas, representadas pelas proteínas do capsídeo e envelope. A única proteína do capsídeo (proteína C) tem um peso molecular de aproximadamente 30.000 daltons. O envelope dos *Alphavirus* consiste de uma bicamada lipídica, rica em colesterol e esfingolípídeos, derivada da membrana plasmática que

contém duas glicoproteínas virais (E1 e E2) de pesos moleculares de 48.000 a 52.000 daltons (Figura 3) (Kielian *et al.*, 2000). Alguns *Alphavirus* apresentam uma terceira proteína (E3) de peso molecular de 10.000 a 12.000 daltons, entre eles o *Semliki Forest virus* (SFV). As glicoproteínas estão intimamente emparelhadas formando trímeros que lembram "picos" na superfície do vírus, e tem como funções a fixação, fusão e penetração do vírus na célula (Wahlberg *et al.*, 1989; Schmaljohn *et al.*, 1996; Napoleão-Pego *et al.*, 2014).



**Figura 3: Estrutura dos *Alphavirus*.** Fonte: ExPASy Bioinformatics Resource Portal.

A maioria dos *Alphavirus* são transmitidos por artrópodes, excluindo-se apenas o *Salmon pancreas disease virus* (SPDV) e o *Southern elephant seal virus* (SESV). Apresentam uma ampla gama de hospedeiros, tais como peixes, equinos, pássaros, anfíbios, répteis, roedores, porcos, seres humanos e primatas não humanos, bem como insetos (que incluem espécies de mosquitos de pelo menos 6 gêneros), carrapatos e piolhos (Gould *et al.*, 2010; Vasilakis & Tesh, 2015). Os *Alphavirus* transmitidos por artrópodes compartilham cerca de 40% de identidade de aminoácidos das proteínas estruturais e 60% de proteínas não estruturais (Gould *et al.*, 2010).

A transmissão dos *Alphavirus* aos seres humanos é feita através da picada de mosquitos do gênero *Culex spp* e *Aedes* (*A. albopictus* e *A. aegypti*), em um ciclo envolvendo hospedeiros vertebrados (Weaver *et al.*, 2004). Dez dos *Alphavirus* transmitidos por artrópodes são considerados de importância significativa em termos de saúde pública, devido, principalmente, à recente reemergência da febre Chikungunya na Ásia e Brasil (Gould *et al.*, 2010; <http://portalsaude.saude.gov.br/>).

As arboviroses causadas pelo *Alphavirus* estão globalmente distribuídas e causam considerável mortalidade e morbidade. De maneira geral, a doença pode ocorrer de duas formas, dependendo do vírus: uma é caracterizada pela presença de encefalite (vírus da *Encefalite Equina Oriental, Ocidental ou Venezuelana*) e outra por artralgias e artrites (CHIKV, RRV, MAYV e SINV). Os vírus que causam encefalites têm o sistema nervoso central como um alvo claro, causando degeneração e necrose dos neurônios. O CHIKV é o protótipo para aqueles que causam doença febril aguda, que dura em média de 3 a 7 dias e é acompanhada por mal-estar, erupções cutâneas, poliartralgias e artrites. Os vírus *O'nyong nyong virus* (ONNV), MAYV e RRV são antigenicamente relacionados ao CHIKV, causando manifestações clínicas semelhantes ou idênticas (Shope, 1980; Schmaljohn *et al.*, 1996). As principais alfaviroses estão descritas na Tabela II.

**Tabela II:** Principais *Alphavirus* no mundo associados com doenças humanas

Vírus	Síndrome clínica	Vetor	Hospedeiro	Distribuição
CHIKV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Primatas, humanos	Américas, África, Índia, Ásia
MAYV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Primatas, humanos	Américas
EEV	Doença febril, encefalite	Mosquito	Roedores, cavalos	Américas
RRV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Mamíferos, humanos	Austrália
ONNV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Primatas	África
SINV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Pássaros	Norte da Europa, África, Ásia e Austrália
SFV	Doença febril, erupção cutânea, encefalite	Mosquito	Pássaros	África
BFV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Marsupiais	Austrália

**Fonte:** Adaptado de Rulli *et al.*, 2007. CHIKV (*Chikungunya virus*); MAYV (*Mayaro virus*); EEV (*Eastern equine encephalitis virus*); RRV (*Ross river virus*); ONNV (*O'nyong nyong virus*); SINV (*Sindbis virus*); SFV (*Semliki forest virus*); BFV (*Barmah forest virus*)

Os representantes do gênero *Alphavirus* são agentes causadores de uma ampla gama de doenças em seres humanos e animais, cuja distribuição é considerada cosmopolita. As infecções humanas evoluem com sintomas clínicos não específicos, que são semelhantes àqueles

causados por outros arbovírus (Coffey *et al.*, 2013). Após a picada do vetor artrópode, o vírus replica-se no sítio primário da infecção e há uma viremia que coincide com o início abrupto de febre, calafrios, mal-estar e dores. A viremia diminui em 3 a 5 dias, e os anticorpos no sangue aparecem dentro de 1 a 4 dias após o início dos sintomas. Após a fase aguda, inicia-se a fase convalescente, que pode ser acompanhada por artralgia altamente dolorosa e artrite. Esses sintomas crônicos podem perdurar por semanas, meses ou anos, causando doença incapacitante e envolvendo principalmente tornozelos, pulsos, joelhos e todas as pequenas articulações das extremidades (Gardner *et al.*, 2010; Assunção-Miranda *et al.*, 2013).

### 2.3- Artrite induzida por *Alphavirus*

As alfaviroses, como as causadas pelo CHIKV, RRV, SINV, ONNV e MAYV, estão associadas a surtos de doenças crônicas reumáticas em seres humanos, em todo o mundo, causando considerável morbi-mortalidade (Chen *et al.*, 2015). Nos últimos anos, com base em estudos epidemiológicos, observou-se aumento do número de casos clínicos de artralgia e artrite, ambos associados à infecção por *Alphavirus* e relacionados à persistência do vírus no organismo (Toivanen *et al.*, 2008).

Os sintomas clínicos agudos causados pela infecção pelos *Alphavirus* apresentam período relativamente curto de viremia (3 a 7 dias). O período de incubação varia de 7 a 12 dias, seguido por febre, mal-estar, cefaleia, erupção cutânea, mialgia, vômitos (Suhrbier *et al.*, 2012). Posteriormente, iniciam-se os sintomas crônicos, considerados principal resposta pela persistência do vírus na fase tardia da infecção. A artralgia começa nesse período e pode ser altamente dolorosa e incapacitante, acometendo principalmente articulações como as mãos, punhos, cotovelos, pés e joelhos (Gardner *et al.*, 2010; Assunção-Miranda *et al.*, 2013).

Os mecanismos pelos quais os alfavírus induzem artrite têm sido extensivamente investigados, e até o momento, há evidências que podem estar associados aos seguintes fatores: a replicação do vírus em tecidos e células alvos, incluindo macrófagos e células musculares; o recrutamento e ativação de macrófagos, células NK e linfócitos T para o sítio da infecção, aumentando os mediadores inflamatórios; a persistência do vírus e/ou produtos virais nas articulações e tecidos musculares. Entretanto, os mecanismos pelos quais os Alfavirus induzem a artrite não são bem elucidados e pouco se sabe sobre a patogênese da doença crônica causada (Assunção-Miranda *et al.*, 2013).

Assim, os macrófagos assumem importante papel nos sintomas crônicos das alfavirose, uma vez que podem ser persistentemente infectados, e ainda, quando presentes no ambiente sinovial são capazes de secretar diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, além de fatores de crescimento e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Szekanecz & Koch, 2007; Assunção-Miranda *et al.*, 2013).

As MMPs constituem-se de um grupo de enzimas proteolíticas zinco-dependentes (endopeptidases) responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais. Essas participam do remodelamento da matriz extracelular e facilitam a entrada de células inflamatórias nos tecidos alvo, atuando em processos tanto fisiológicos, quanto patológicos (Zhou *et al.*, 2005). Logo, vários estudos investigaram a participação dessas citocinas no envolvimento de disfunções patológicas desencadeados por infecções virais, incluindo o desenvolvimento da artrite ocasionada por *Alphavirus*, melhor elucidando os possíveis mecanismos envolvidos na artrite viral, bem como perspectivas para terapias para esse modelo de artrite (Keogh *et al.*, 2003; Lidbury *et al.*, 2008; Assunção-Miranda *et al.*, 2013; Roe *et al.*, 2012).

Ainda, estudos têm demonstrado que algumas citocinas e quimiocinas secretadas durante a infecção pelos *Alphavirus* são as mesmas que estão associadas com a progressão da artrite reumatoide (AR) (Theilacker *et al.*, 2013). Esse fato sugere mais uma vez que a gravidade da doença e persistência dos sintomas estão associados tanto à replicação viral quanto à presença de mediadores pró-inflamatórios (Bouquillard & Combe, 2009; Suhrbier & Mahalingam, 2009).

Apesar dos riscos que a população está sujeita e ao grande número de evidências do acometimento articular causado pela infecção pelos *Alphavirus*, ainda há vigilância inadequada no que se refere à infecção por estes vírus e poucos estudos pautando suas características patogênicas (Chen *et al.*, 2015). Neste contexto, destaca-se o MAYV que, devido ao grande potencial de urbanização e emergência, pode se tornar importante problema de saúde pública nas Américas e especialmente no Brasil, que já vive uma epidemia de CHIKV e outros arbovírus (Figueiredo & Figueiredo, 2014).

## 2.4- Mayaro virus (MAYV)

O MAYV foi primeiramente isolado em 1954 no sangue de trabalhadores rurais febris, próximo à cidade de Mayaro, em Trinidad e Tobago. Após o primeiro isolamento do MAYV, acreditava-se que ele era restrito às áreas de florestas úmidas da região tropical da América do Sul e Central. Entretanto, muitos países, ao longo dos anos, já registraram casos, surtos e até mesmo epidemias da doença causada pelo vírus, conhecida como febre Mayaro (Anderson *et al.*, 1957; Aitken *et al.*, 1960; Strauss & Strauss, 1994; Muñoz & Navarro, 2012).

Casos de febre Mayaro têm sido reportados em países como Peru, Brasil, Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela, Colômbia, Equador, Panamá, Bolívia, Costa Rica, Guatemala e México (Schaeffer *et al.*, 1959; Karabatsos, 1985; Pinheiro *et al.*, 1986; Heraud *et al.*, 1999; De Figueiredo *et al.*, 2004; Navarrete-Espinosa & Gomez-Dantes, 2006; Forshey *et al.*, 2010; Muñoz & Navarro, 2012; Halsey *et al.*, 2013). Também há relatos de turistas alemães, holandeses, franceses e suíços que ao visitarem a bacia Amazônica dos países acima citados tenham sido infectados com o MAYV (Hassing *et al.*, 2010; Receveur *et al.*, 2010; Neumayr *et al.*, 2012; Theilacker *et al.*, 2013). A Figura 4 mostra a distribuição dos casos da febre Mayaro e também de países com evidências da circulação do vírus.



Figura 4: Distribuição do MAYV nas Américas. Fonte: Mota *et al.*, 2015.

No Brasil, o MAYV foi isolado pela primeira vez em 1955 durante um surto em uma comunidade rural próximo à cidade de Belém, no estado do Pará. Atualmente, o vírus é endêmico na região Amazônica, onde pelo menos quatro epidemias foram relatadas no Estado do Pará: em uma comunidade de trabalhadores da pedreira no rio Guamá, em 1955; em Belterra, em uma aldeia de plantações de borracha em 1978; em Conceição do Araguaia em 1981; em Benevides, no ano de 1991. Também neste ano, houve surto na cidade de Peixe, no estado de Tocantins. Entre os anos de 2007-2008, de 600 amostras de sangue de moradores febris da capital do estado do Amazonas, Manaus, 33 foram detectadas com a presença do vírus (Aitken *et al.*, 1960; Pinheiro *et al.*, 1981; Vasconcelos *et al.*, 1998; Mourão *et al.*, 2012).

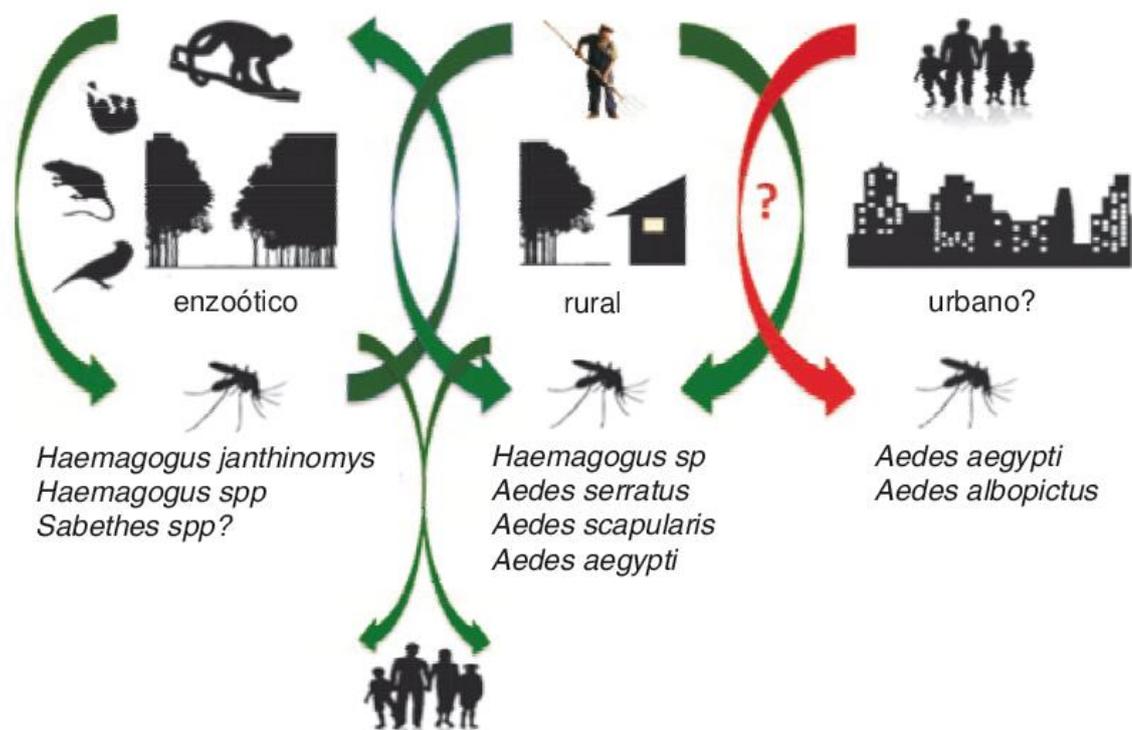
O MAYV tem sido encontrado principalmente na região Norte do Brasil, mas também já houve surto na região Centro-oeste na cidade de Itarumã, estado de Goiás, em 1987. Além disso, o vírus foi isolado de três pacientes paulistanos que foram infectados em uma visita à cidade de Camapuã, estado de Mato Grosso do Sul, no ano de 2000. Anticorpos específicos contra o MAYV também foram encontrados em índios Xavantes do estado de Mato Grosso e em habitantes de áreas rurais do estado de Goiás no Brasil Central (Neel *et al.*, 1968; Pinheiro *et al.*, 1986; Vasconcelos *et al.*, 1998; Coimbra *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013; Zuchi *et al.*, 2014; Pauvolid-Correa *et al.*, 2015).

Em relação aos genótipos do MAYV, parece haver dois diferentes em circulação. O primeiro, designado como D, foi isolado em Trinidad Tobago, Peru, Guiana, Suriname, Bolívia e Brasil. O segundo, designado como L, tem sido observado apenas no Brasil e apresenta uma diferença de 15-19% comparado ao genótipo D. Como parece ter havido uma baixa diversidade genética entre os isolados de cada genótipo, acredita-se que ambos sejam mantidos em ciclos enzoóticos independentes (Powers *et al.*, 2006; Napoleão-pego *et al.*, 2014).

Como o MAYV apresenta um genoma de RNA, ele apresenta uma grande plasticidade genética, devido à alta taxa de mutação, o que aumenta a probabilidade de adaptação a novos hospedeiros, tanto vertebrados quanto invertebrados (Mandell *et al.*, 2002; Forshey *et al.*, 2010). O MAYV é mantido na natureza em um ciclo enzoótico, similar ao ciclo do vírus da febre amarela (Figura 5). Durante os ciclos silvestres e rurais, vários vetores artrópodes transmitem o vírus a hospedeiros primatas não humanos e outros mamíferos. Os vetores primários são mosquitos do gênero *Haemagogus*, os secundários são dos gêneros *Culex sp*, *Sabethes sp*, *Psorophora sp*, *Coquillettidia sp* e *Aedes sp*. Outros hospedeiros como pássaros, marsupiais e roedores, aliados aos vetores primários e secundários, aumentam ainda mais as

chances de disseminação do vírus (Calisher *et al.*, 1974; Monath, 1988; Tesh *et al.*, 1999; De Thoisy *et al.*, 2003; Weaver & Reisen, 2010).

A infecção humana pelo MAYV, baseada nos dados epidemiológicos atuais, é considerada acidental e apresenta um risco maior para aqueles indivíduos expostos a áreas de florestas. A transmissão urbana tem sido considerada, principalmente depois que estudos demonstraram que o mosquito da espécie *Aedes aegypti*, tipicamente urbano e vetor do DENV, pode ser um potencial vetor do MAYV. (Tesh *et al.*, 1999; Powers *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2011).



**Figura 5: Ciclo de transmissão do MAYV.** Em verde os ciclos mais prováveis e em vermelho um ciclo urbano hipotético. Fonte: Adaptado de Muñoz & Navarro, 2012.

A expansão geográfica do MAYV pode aumentar ainda mais com viagens internacionais, eventos como Copa do Mundo de Futebol, Olimpíadas, festivais, entre outros. Essa expansão do MAYV aliada à urbanização de áreas florestais, desmatamento e a possibilidade de que mosquitos da espécie *Aedes aegypti* possam transmitir tal vírus o caracterizam como um vírus emergente. Em um futuro próximo, o MAYV pode se tornar um problema de saúde pública, assim como aconteceu com o CHIKV, que é um *Alphavirus* estreitamente relacionado ao MAYV (Pialoux *et al.*, 2007; Figueiredo & Figueiredo, 2014).

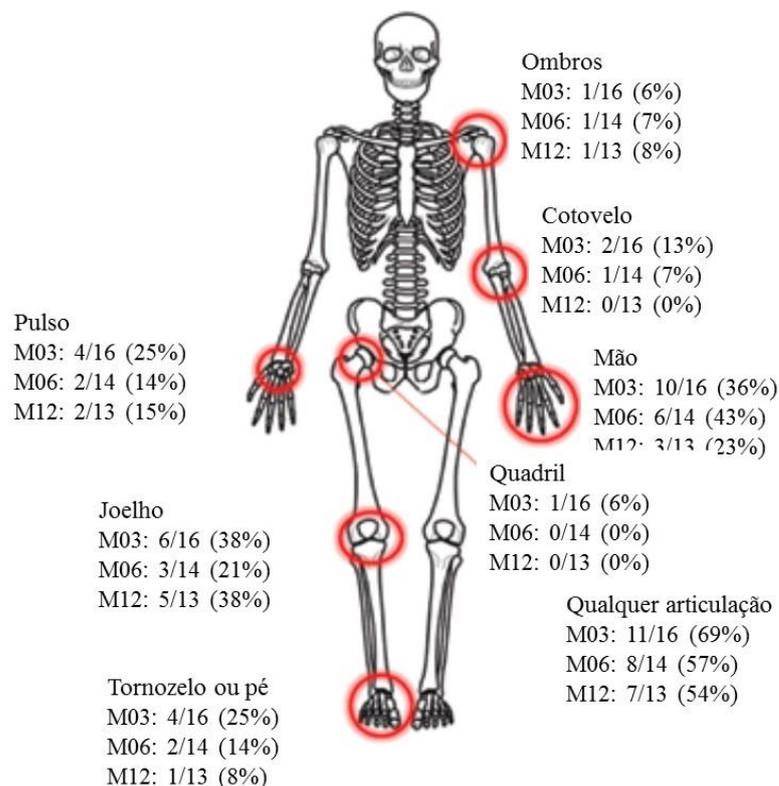
Devido a toda essa importância para a saúde pública, o MAYV foi incluído, em 2011, pelo Ministério da Saúde, na lista de doenças de notificação compulsória, ou seja, aquelas que devem ser comunicadas obrigatoriamente diante de suspeitas (Ministério da Saúde, Portaria Nº104, de 25 de Janeiro de 2011). Como a febre Mayaro atinge regiões pobres e tem pouca atenção governamental, a doença é ainda muito negligenciada. Além disso, por apresentar uma vigilância inadequada em áreas endêmicas e como suas manifestações clínicas são muito semelhantes às da dengue, há muitos casos de subnotificação ou até mesmo diagnósticos errados da febre Mayaro. Estima-se que 1% de todas as doenças febris, com os mesmos sintomas da dengue, no norte da América do Sul sejam causadas, na verdade, pelo MAYV (Forshey *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2015).

A febre Mayaro é uma doença febril autolimitada. Apresenta-se em duas fases, uma aguda e outra convalescente. A fase aguda apresenta um curto período de viremia, com duração de 3 a 5 dias. O período de incubação varia de 7 a 12 dias, que é acompanhado de um início súbito de febre, dor de cabeça frontal, artralgia, mialgia, edema articular, calafrios, fotofobia, dor retro orbital, mal-estar, vômitos, diarreia, erupção cutânea observada mais em peito, costas, braços e pernas. As erupções cutâneas geralmente aparecem no quinto dia após a infecção e persiste por três dias. Em alguns casos, há a presença de náuseas, tosse, odinofagia, dor abdominal, congestão nasal, prurido e hemorragia nas gengivas. Cerca de 20% dos casos apresentam inchaço das pequenas articulações, especialmente nos pulsos, dedos, tornozelos e dedos dos pés. A presença de prurido é mais comum em crianças do que adultos, geralmente aparece no quinto dia da doença e persiste por 3-4 dias. Os demais sintomas normalmente persistem por 2 a 5 dias. Recentemente, outros sintomas foram descritos no México, em que pacientes apresentaram hemorragia, trombocitopenia e icterícia (Halsey *et al.*, 2013; Mota *et al.*, 2015).

Após a fase aguda inicia-se a fase convalescente. Esta fase pode ser acompanhada por artralgia e artrite, o que pode perdurar por semanas, meses ou anos. A artralgia começa com o início dos demais sintomas, e pode ser altamente dolorosa e incapacitante afetando as mãos, punhos, cotovelos, pés, joelhos e demais articulações menores (Figura 6). Os pacientes podem apresentar também ligeira leucopenia, albuminúria e aumento da taxa de sedimentação de eritrócitos, dos níveis séricos de alanina aminotransferase e uma moderada linfocitose (Halsey *et al.*, 2013; Mota *et al.*, 2015).

Geralmente, a febre Mayaro possui evolução benigna, com resolução espontânea. Houve apenas um relato isolado de morte de um paciente com sintomas de encefalite no México em

2001 (Taylor *et al.*, 2005; Navarrete-Espinosa & Gomez-Dantes, 2006). Mas, de maneira geral, o sintoma mais grave da doença é a artralgia, que pode persistir por meses e até mesmo por anos. Por ser um sintoma muito forte, a artralgia causa uma elevada perda de produtividade e sobrecarga dos serviços médicos públicos (Tesh *et al.*, 1999; Theilacker *et al.*, 2013).



**Figura 6: Prevalência do envolvimento de articulações na infecção pelo MAYV.** Dados foram obtidos de pacientes após diferentes meses de infecção, na região da Base Amazônica no Peru, entre 2010-2013. M03, M06 e M12: 3, 6 e 12 meses após infecção, respectivamente. Fonte: Adaptado de Halsey *et al.*, 2013.

Atualmente, não há estudos relacionados ao início da infecção pelo MAYV. No entanto, acredita-se que os eventos sejam semelhantes aos dos outros *Alphavirus*. Após a picada do mosquito, os *Alphavirus* parecem ser disseminados no hospedeiro através dos nódulos linfáticos e da microvasculatura. A leucopenia na fase aguda da doença é uma alteração hematológica muito comum de uma infecção de *Alphavirus*, sugerindo uma replicação primária nos leucócitos. O fígado e o baço também são considerados sítios primários de replicação viral, contribuindo para a disseminação do vírus para o osso, tecidos musculares e articulares, que são fortemente associados com processos inflamatórios locais. A idade do hospedeiro, o estado do sistema imune, a virulência da cepa viral e persistência do vírus são determinantes na

patogênese da infecção dos *Alphavirus*. A gravidade da doença e persistência dos sintomas estão associados à extensão da replicação viral e à presença de mediadores inflamatórios no plasma de pacientes ou em tecidos específicos nos modelos animais (Napoleão-Pego *et al.*, 2014).

O aparecimento e a persistência de anticorpos em hospedeiros podem variar consideravelmente entre os pacientes. Além disso, uma infecção pelo MAYV é capaz de induzir anticorpos Imunoglobulina M (IgM), que geralmente são indicativos de infecção recente, mas podem persistir por pelo menos 90 dias após o início dos sintomas. Em infecções secundárias, a produção de IgM pode ocorrer em níveis baixos, no entanto, a IgG, que persiste durante toda a vida do hospedeiro, pode ser um excelente marcador da recorrência de uma infecção quando encontrado em altos níveis (Figueiredo *et al.*, 1989; Torres *et al.*, 2004).

O diagnóstico da febre Mayaro, normalmente, se baseia apenas em sinais e sintomas clínicos, o que pode gerar muita confusão com a dengue e outras arboviroses. Por isso, o método padrão ouro para o diagnóstico do MAYV é o isolamento do vírus. Geralmente, o isolamento viral ocorre a partir da inoculação *in vivo* em cérebros de ratos recém-nascidos ou *in vitro* utilizando células de vertebrados (Vero, BHK-21) ou invertebrados (*Aedes albopictus* clone C6/36) (Pfeffer *et al.*, 1997; Mota *et al.*, 2015). Também podem ser utilizadas para o diagnóstico do MAYV a PCR convencional ou a qPCR, com primers genéricos de *Alphavirus* ou primers vírus-específicos (Bronzoni *et al.*, 2004).

O tratamento da febre Mayaro é baseado no alívio da dor e da febre com analgésicos (paracetamol) e/ou anti-inflamatórios não esteroides (ibuprofeno ou diclofenaco). Atualmente, não há vacinas licenciadas disponíveis para o MAYV, havendo apenas duas tentativas descritas na literatura (Figueiredo & Figueiredo, 2014; Mota *et al.*, 2015).

Apesar de já ter sido isolado em humanos de várias regiões do Brasil e das Américas, são poucos os estudos pautando o MAYV. Alguns apenas descreveram casos isolados ou surtos de doença em humanos, outros mostraram a evidência da circulação do vírus em certas populações por meio de levantamentos soro epidemiológicos. Assim, mais estudos são necessários para suprir o limitado conhecimento sobre a biologia e imunologia do MAYV. Nesse contexto, uma das abordagens foi investigar o possível envolvimento do estresse oxidativo na infecção pelo MAYV desde que, recentemente, a patogênese de várias doenças virais tem sido relacionada a ocorrência desse evento.

## 2.5- Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Estresse Oxidativo

Compreende-se como radical livre um átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons, ou seja, elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, o que o torna instável e altamente reativo, como por exemplo, os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1990; Halliwell, 1992). Os radicais livres têm a capacidade de existir independentemente e apresentam uma vida muito curta. São divididos em quatro categorias principais com base em seu átomo central, sendo eles o oxigênio, nitrogênio, enxofre e cloro (Halliwell & Gutteridge, 2007). Na natureza, duas das substâncias mais importantes que podem gerar os radicais livres é o oxigênio em seu estado fundamental ( $O_2$ ) e o óxido nítrico (NO), que se apresenta como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e é um importante vasodilatador (Moncada *et al.*, 1991; Dusting & Macdonald, 1995; Ignarro, 1998).

O termo coletivo “Espécies Reativas de Oxigênio” inclui não somente os radicais livres, mas também outros átomos e moléculas que não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Halliwell, 1992) (Tabela III).

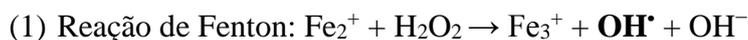
**Tabela III:** Algumas espécies reativas e suas meias-vidas

Espécie Reativa de Oxigênio	Meia-vida (segundos)
$OH^{\bullet}$ Radical hidroxil	$10^{-9}$
$HOO^{\bullet}$ Radical hidroperoxil	$10^{-8}$
$RO^{\bullet}$ Radical alcóxil	$10^{-6}$
$ROO^{\bullet}$ Radical peroxil	7
$ONOO^{\bullet}$ Peroxinitrito	0,05 - 1
$H_2O_2$ Peróxido de hidrogênio	Variável
$O_2^{\bullet-}$ Radical superóxido	Variável
$O_2$ Oxigênio singlete	$10^{-5}$
NO Radical óxido nítrico	1 - 10
HOCl Ácido hipocloroso	Estável

**Obs.:** R é um lipídeo, por exemplo, o linoleato.

**Fonte:** Jordão *et al.*, 1998

O ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , produzido a partir de processos metabólicos ou por irradiação física que "ativa" o oxigênio, é considerado a ERO "primária", e pode ainda interagir com outras moléculas para gerar as EROs "secundárias" (Valko *et al.*, 2005). O  $O_2^{\cdot-}$  é gerado pela redução de um elétron do  $O_2$ . Quando o  $O_2$  é reduzido por dois e três elétrons, são produzidos o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), respectivamente. Através da redução total do  $O_2$ , por quatro elétrons, são produzidas duas moléculas de  $H_2O$  (Simic, 1988). A espécie reativa considerada a mais potente em sistemas biológicos é o radical hidroxil  $OH^{\cdot}$ , que é gerado pelas reações de Fenton (1) e de Haber-Weiss (2), na presença de um metal de transição, geralmente ferro (Fe) ou cobre (Cu). O  $OH^{\cdot}$  apresenta uma alta reatividade, o que o torna muito nocivo, além de possuir uma meia vida muito curta *in vivo*, aproximadamente  $10^{-9}$  segundos (Pastor *et al.*, 2000).



De acordo com Beckman & Ames (1997), as EROs são formadas em resposta a estímulos extracelulares e intracelulares. Estima-se que uma célula humana é exposta a cerca de  $1,5 \times 10^5$  tipos de reações oxidativas, a partir de radicais hidroxil e outras espécies reativas (Ames *et al.*, 1993; Halliwell & Cross, 1994). Entre os eventos que geram essas espécies reativas as principais fontes são os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, onde do total de  $O_2$  mitocondrial consumido, cerca de 1% a 2% é desviado para a formação de EROs, e este desvio, acredita-se, ser tecido e espécies dependentes (Stowe & Camara, 2009).

As variadas reações dos radicais livres podem levar à formação de complexos com proteínas, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, formação de produtos de oxidação de tióis, peróxidos lipídicos, polímeros, epóxidos, endoperóxidos e produtos de cisão, como alquenais e hidroalquenais, que são citotóxicos (Halliwell & Cross, 1994).

Reações entre radicais livres e ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular podem resultar no radical peroxila de ácido graxo ( $R-COO^{\cdot}$ ), que apresenta a capacidade de atacar cadeias laterais de ácidos graxos adjacentes e iniciar a produção de outros radicais lipídicos. Estes radicais podem se acumular na membrana celular e os produtos finais da peroxidação lipídica podem causar vários efeitos danosos às funções celulares, tais como citotoxicidade e mutagênese (Cai & Harrison, 2000).

Além disso, a lipoperoxidação talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a modificações da permeabilidade, que alteram o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias. Isso resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (Vaca *et al.*, 1988; Barber & Harris, 1994). Nos sistemas biológicos a lipoperoxidação pode ocorrer principalmente por duas vias: uma via enzimática envolvendo as ciclo-oxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos poli-insaturados; outra via de peroxidação não enzimática, que envolve a participação de EROs, espécies reativas de nitrogênio, metais de transição e outros radicais livres (Al Mehdi *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1995).

Os efeitos benéficos das EROs ocorrem em concentrações baixas/moderadas e envolvem funções fisiológicas em respostas celulares, como por exemplo, a defesa contra agentes infecciosos, sistemas de sinalização intracelular e indução de resposta mitogênica. Como efeitos prejudiciais, as EROs causam potenciais danos biológicos, que afetam estruturas celulares, incluindo lipídeos e membranas, proteínas e ácidos nucleicos (Kovacic & Jacintho, 2001; Valko *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2007; Ridnour *et al.*, 2005). Normalmente, isto ocorre em sistemas biológicos quando há uma superprodução de EROs de um lado e uma deficiência nos sistemas de defesas antioxidantes de outro lado.

Uma definição clássica de estresse oxidativo é a de Sies (1985), onde o estresse oxidativo “é um desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes, em favor dos oxidantes”, mas esse conceito de “equilíbrio” implica que os sistemas biológicos respondam da mesma forma para uma diminuição de pró-oxidantes e um aumento de antioxidantes. Entretanto, múltiplos sistemas estão envolvidos, tais como sinalização redox, o que nos leva a acreditar que esses sistemas não respondem da mesma maneira aos oxidantes e antioxidantes, uma vez que existem muitos estudos que mostram que os antioxidantes tornam-se pró-oxidantes em algumas condições. Dessa forma, um conceito mais atual sobre “uma ruptura/desregulação da sinalização e controle redox”, proposta por Jones (2006) é uma definição mais abrangente de estresse oxidativo (Silva, 2011).

Sabe-se que os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídeos insaturados nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal.

A disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidados formados são fatores que influenciam o tipo de resposta de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo (Jordão *et al.*, 1998).

O excesso de EROs produzido pode causar danos ao DNA, lipídeos e proteínas levando à perda da integridade e funcionalidade celular. Esse dano oxidativo acumula durante o ciclo de vida, e acredita-se que desempenha um papel chave no desenvolvimento de doenças dependentes da idade tais como o câncer, arteriosclerose, artrite, doenças neurodegenerativas, distúrbios, entre outras (Halliwell & Gutteridge, 1999). Dessa forma, para prevenir a produção de EROs e manter a homeostase celular, existe um sistema de defesa antioxidante que, sob condições fisiológicas, não permite ação prejudicial excessiva das EROs (Nakashima *et al.*, 2003; Forman & Dickinson, 2004; Armogida *et al.*, 2012).

## 2.6- Defesas Antioxidantes

O termo antioxidante se refere a “qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo” (Halliwell & Gutteridge, 2007). A eficácia do sistema antioxidante depende da molécula geradora do estresse oxidativo, da sua localização, intra ou extracelular e da velocidade da reação com as moléculas-alvos. Observa-se que mesmo em condições fisiológicas, tal sistema não é capaz de uma total prevenção na formação/atuação das EROs (Ratnam *et al.*, 2006).

O sistema de defesa antioxidante se divide em enzimático e não enzimático. Entre os antioxidantes não enzimáticos, a grande maioria deles são obtidos da dieta, e são classificados em várias classes, das quais os polifenóis são a maior. As outras classes incluem as vitaminas C, E ( $\alpha$ -tocoferol), carotenóides, compostos organosulfurados, minerais e cofatores que desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana (Ratnam *et al.*, 2006).

Entre as principais enzimas antioxidantes estão a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutaciona peroxidase. As enzimas SOD são metaloenzimas que protegem os alvos do ataque do ânion superóxido em até 97%. Elas são a primeira e mais importante linha do sistema de defesa enzimático. Estão presentes essencialmente em todas as células do corpo e atualmente existem em três isoformas: a citoplasmática, Cu/ZnSOD (ou SOD1), a mitocondrial, MnSOD (ou SOD2) e a extracelular, Cu/ZnSOD (ou SOD3) (Perry *et al.*, 2010).

A SOD1 é a principal forma intracelular de SOD, sendo responsável por 80% da proteína total. Estudos mais antigos relataram que a SOD1 é principalmente citosólica (Slot et al., 1986), mas estudos mais recentes a encontraram em toda a célula, incluindo no espaço intermembranar mitocondrial e no núcleo (Tsang *et al.*, 2014).

Todas as isoformas da SOD agem por um mecanismo comum de dismutação do ânion superóxido, produzindo o peróxido de hidrogênio, que é menos potente em relação àquele, como mostra a equação de redução (3):



Estas isoformas da SOD apresentam funções semelhantes. Entretanto, características como estrutura proteica, localização cromossômica, cofatores metálicos, distribuição gênica e a compartimentalização celular são diferentes umas das outras. Comparações genéticas indicam semelhanças nos genes da SOD1 e SOD3 em certos níveis de homologia de aminoácidos, enquanto que a SOD2 não compartilha homologia de aminoácidos substancial em comparação às outras isoformas (Parge *et al.*, 1992). A expressão gênica e a atividade da SOD desempenham um papel fundamental no equilíbrio da concentração de EROs dentro da célula (Forman, 2007; Liu, 2008).

Em condições inflamatórias, a produção do peróxido é aumentada, pois este desenvolve um importante papel na resposta imune de mamíferos. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tem ação antimicrobiana e facilita a morte de micro-organismos invasores, pois através de oxidação lipídica a membrana plasmática é degradada (Guerra *et al.*, 2007). Mas em excesso, é muito danoso às células. Ele pode interagir com o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) e formar o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). O peroxinitrito é um poderoso pró-oxidante capaz de afetar células vizinhas (Beckman *et al.*, 2007). Para tentar evitar esse excesso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, existem as enzimas que o converte em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, uma delas é a Catalase (CAT).

A CAT é uma enzima homotetrâmera em que cada monômero (62.5kDa) contém um grupo heme responsável pela atividade enzimática (Nagem *et al.*, 1999). É expressa em todos os órgãos principais do corpo, especialmente no fígado, nos rins, e nos eritrócitos (Masters *et al.*, 1986). A CAT está localizada principalmente nos peroxissomos, mas também na mitocôndria e no núcleo. A enzima promove a conversão de peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular (Glorieux *et al.*, 2015). O peróxido de hidrogênio pode se difundir facilmente através

das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical OH• em seu interior (Barreiros *et al.*, 2006). Além disso, demonstrou-se que as atividades da CAT e SOD apresentam uma correlação linear com o tempo de vida em mamíferos (Cutler, 1984).

Alterações na expressão da CAT após exposição de curto tempo ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser influenciada por diversos fatores: tempo de exposição, concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, capacidade basal da enzima antioxidante das células, e o modelo celular utilizado (Glorieux *et al.*, 2015).

Baixos níveis da expressão dessa enzima correlacionam-se com uma alta produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual está envolvido na ativação de vias de sinalização para induzir a proliferação, migração e invasão em células cancerosas (Wu & Yotnda, 2011; Sen *et al.*, 2012).

A CAT apresenta uma das mais altas taxas de rotatividade para todas as enzimas, sendo que uma molécula de CAT pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio a cada minuto (Valko *et al.*, 2006), de acordo com a reação (4):



Outro sistema que converte o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular é o sistema de defesa da Glutathione. A Glutathione é um tripeptídeo linear ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina), sintetizada a partir do glutamato, cisteína e glicina. É o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos, sua concentração é de aproximadamente 2mM e mais de 10 mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente (Joseph *et al.*, 1997). Constitui um sistema de defesa endógeno muito importante que tem sido implicado na modulação imune e em respostas inflamatórias (Deneke & Fanburg, 1989; Droge *et al.*, 1994). Entre estes eventos incluem a modulação da sinalização redox, da função imune, regulação da proliferação celular, apoptose e respiração mitocondrial (Evans *et al.*, 1991; Brown, 1994).

Na célula, cerca de 90% da Glutathione está localizada no citoplasma, 10% na mitocôndria e uma pequena porcentagem no retículo endoplasmático (Hwang *et al.*, 1992). Aproximadamente 85% da Glutathione celular total está livre, enquanto que o resto está ligado às proteínas (Sies, 1999).

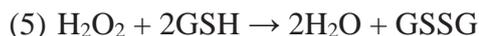
A Glutathione é sintetizada no meio intracelular (exceto em células epiteliais) em duas etapas. Na primeira, a síntese envolve a formação de glutamyl-cisteína a partir do glutamato e da cisteína em uma reação dependente de ATP e catalisada pela  $\gamma$ -GCS ( $\gamma$ -glutamyl-cisteína-

sintetase), que requer  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  como cofator. Esta é considerada uma etapa limitante, pois, depende da biodisponibilidade da cisteína e da atividade da  $\gamma$ -GCS, que é inibida por feedback pela Glutathiona reduzida (GSH) (Meister & Anderson, 1983). Na segunda etapa, a glutathiona sintetase (GS) adiciona glicina ao glutamil-cisteína para formar a glutathiona ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina). Caso a conversão da glutamil-cisteína em glutathiona seja insuficiente, uma reação alternativa predomina: a conversão à 5-oxoprolina catalisada pela  $\gamma$ -glutamilciclotransferase (Kanzok *et al.*, 2000). A produção excessiva de 5-oxoprolina ocorre em casos de deficiência hereditária da glutathiona sintetase e é caracterizada por 5-oxoprolinúria, acidose metabólica crônica e distúrbios neurológicos. A biossíntese da GSH pode ser inibida pela butionina sulfoximina (BSO), um inibidor com estrutura similar a um intermediário ativado na reação catalisada pela  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase (Andricopulo *et al.*, 2006).

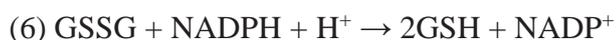
A Glutathiona se apresenta, em mais de 98% do seu total, como Glutathiona reduzida (GSH) e o restante na forma de Glutathiona oxidada (GSSG). A GSH é convertida a GSSG pela Glutathiona peroxidase (GPx), durante períodos de estresse oxidativo e é revertido para a forma reduzida pela Glutathiona redutase (GR). A razão GSH/GSSG é utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos sendo crucial na manutenção da homeostase intracelular (Rotruck *et al.*, 1972; Meister & Anderson, 1983).

A Glutathiona está presente na maioria das células e é o grupamento tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento sulfidril (-SH), presente na cisteína. O fígado sintetiza a Glutathiona e a sua forma exógena pode ser absorvida no intestino, além disso, ela pode ser sintetizada *de novo*, sendo então um antioxidante exógeno e endógeno (Fang *et al.*, 2002). A enzima CAT está presente em maior quantidade apenas nos peroxisomos. Isso faz com que a glutathiona seja importante na defesa contra o estresse oxidativo gerado fisiologicamente ou patologicamente (Fernandez-Checa *et al.*, 1997; Garcia-Ruiz & Fernández-Checa, 2006).

As Glutathionas peroxidases (GPx) são uma família de enzimas que incluem três enzimas dependentes de selênio e uma peroxidase independente desse elemento. Podem ser divididas em dois grupos, celulares e extracelulares. Em geral, a Glutathiona peroxidase é uma proteína tetramérica (85 kDa) e requer 4 átomos de selênio vinculados como porções seleno-cisteína que conferem a atividade catalítica. A GPx reduz o  $H_2O_2$  à  $H_2O$ , oxidando a Glutathiona (Kinnula *et al.*, 1995), conforme a reação (5):

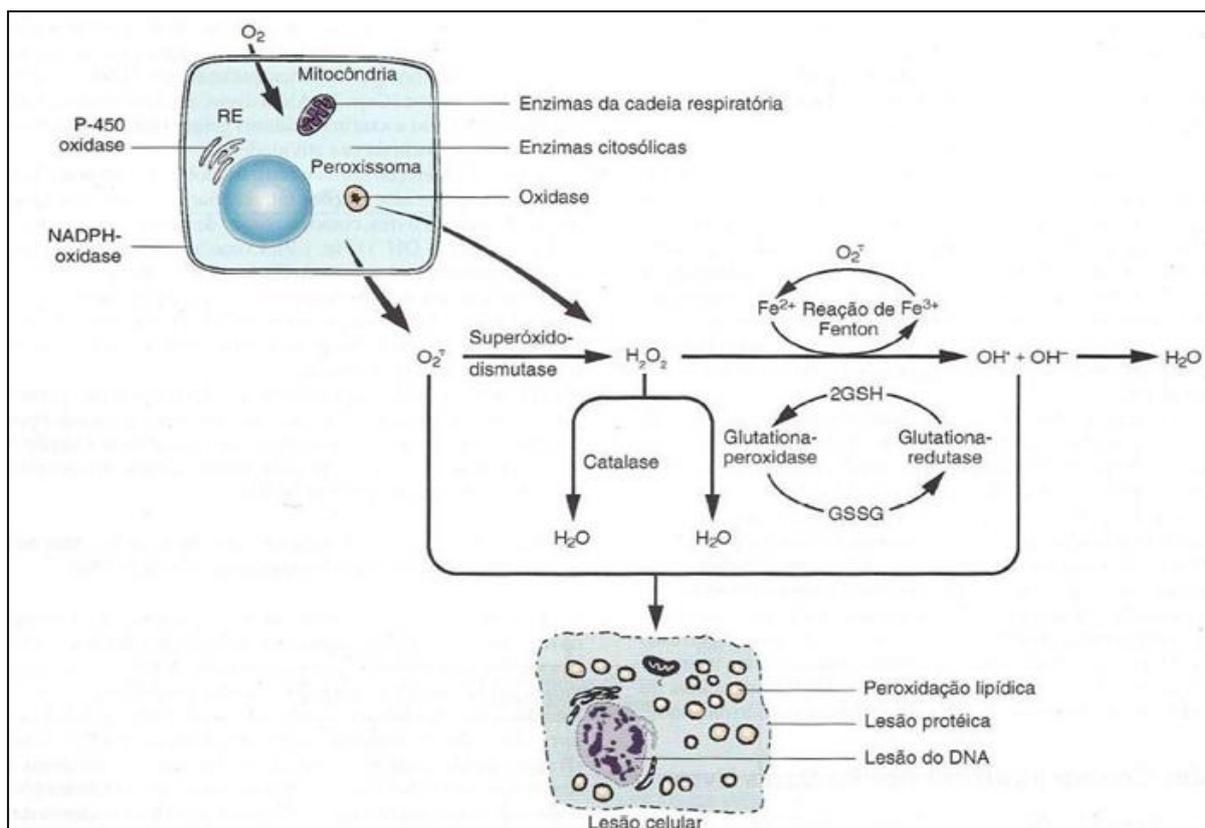


A redução da forma oxidada da Glutationa (GSSG) é catalisada pela GR. Esta enzima não age diretamente na remoção das EROs, porém é responsável pela regeneração da Glutationa na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da Glutationa (Halliwell & Gutteridge, 1989) (reação 6):



Essa capacidade de reciclar a Glutationa faz com que esse ciclo seja essencial para o mecanismo de defesa antioxidante da célula e evite o esgotamento dos tióis celulares (Heffner & Repine, 1989), sendo que para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão GSH/GSSG deve ser mantida em níveis altos (Sies & Moss, 1978; Halliwell & Gutteridge, 2007). Para isso, a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) não deixa de estar envolvida com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração da Glutationa. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da Glutationa também fica afetada, pois a GSH não pode ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PDH também pode ser considerada uma enzima antioxidante coadjuvante (Slekar *et al.*, 1996). Além disso, a Glutationa pode através da glutatona-S-transferase (GST) detoxificar aldeídos reativos (como o malondialdeído), hidroxialdeídos, cetoaldeídos- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos que são gerados durante a peroxidação lipídica.

Assim, a CAT e a GPx reduzem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $\text{H}_2\text{O}$ , uma vez que o aumento do  $\text{H}_2\text{O}_2$  inativa lentamente a SOD. Portanto, a CAT e a GPx, ao reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$  conserva a SOD e esta, reduzindo o superóxido, por sua vez, conserva a CAT e a GPx. Baixos níveis da CAT, GPx e SOD, assim como, de superóxido e peróxido de hidrogênio, são então mantidos por um mecanismo de feedback, em organismos normais (Rahman *et al.*, 2006), que pode ser melhor visualizado em conjunto na Figura 7.



**Figura 7: Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes.** O  $O_2$  é convertido em  $O_2^{\cdot-}$  por enzimas oxidativas no retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomas e citosol. O  $O_2^{\cdot-}$  é convertido em  $H_2O_2$  por dismutação e, esse em  $OH^{\cdot}$  pela reação de Fenton catalisada por  $Cu^{2+}/Fe^{2+}$ . O  $H_2O_2$  também é derivado diretamente de oxidases nos peroxissomas. Outro radical potencialmente lesivo não é mostrado: o oxigênio singlete. A resultante lesão por radicais livres dos lipídeos (peroxidação), proteínas e DNA acarreta várias formas de lesão celular. Repare que o superóxido catalisa a redução de  $Fe^{3+}$  em  $Fe^{2+}$ , aumentando assim a geração de  $OH^{\cdot}$  pela reação de Fenton. As principais enzimas antioxidantes são a SOD, CAT e GPx. GSH, glutaciona reduzida; GSSG, glutaciona oxidada; NADPH, forma reduzida de fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotinamida.  
Fonte: <http://www.lookfordiagnosis.com/meshinfo.php?term=Super%C3%B3xido+Dismutase&lang=3>

## 2.7- Estresse Oxidativo e Infecções por Vírus

As EROs estão intimamente envolvidas na regulação do metabolismo e na fisiologia celular, o que é muito relevante no contexto das doenças infecciosas causadas pelos vírus, os quais dependem dos mecanismos de biossíntese das células do hospedeiro. Assim, sabe-se que baixos níveis de EROs ativam a proliferação celular e a maioria dos vírus multiplica-se melhor em células que estão proliferando (Peterhans, 1997a, b). No entanto, com o progresso da infecção, mais EROs são formadas afim de conter a multiplicação viral, levando a um aumento na

produção dessas espécies que culmina com o estresse oxidativo e seus efeitos tóxicos para o hospedeiro.

Dessa forma, o estresse oxidativo tem surgido como fator chave na progressão da patogênese causada por diversos agentes etiológicos virais, como o vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV), vírus influenza, vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), DENV, vírus respiratório sincicial (RSV), vírus linfotrófico humano de células T (HTLV-1), vírus da estomatite vesicular (VSV), vírus Rift Valley (RVFV), vírus do papiloma humano (HPV) e os *Alphavirus* CHIKV e SINV (Dröge *et al.*, 1994; Akaike *et al.*, 1996; Schwarz, 1996; Peterhans, 1997, a e b; Lin *et al.*, 1999; Yoshinaka *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2002; Stehbens, 2004; Abel *et al.*, 2009; Hosakote *et al.*, 2009; Seet *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2010; Hosakote *et al.*, 2011; Dhanwani *et al.*, 2011; Narayanan *et al.*, 2011; Joubert *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Claus *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2014).

Com relação ao estresse e a infecção por alfavírus, Nakatsue e colaboradores (1998) demonstraram que a infecção pelo SINV ativa vias de sinalização através das proteínas cinases ativadas pelo estresse, como JNK e p38 MAPK, sugerindo que a infecção viral induz respostas de estresse na célula hospedeira e que isso pode modificar a replicação viral e a morte celular. Ainda, Lin *et al.* (1999) demonstraram que a inibição dos níveis de superóxido intracelular é necessária para a apoptose induzida pelo SINV. Ressaltando que, para esse *Alphavirus*, o estresse oxidativo está envolvido na apoptose.

Dhanwani *et al.* (2011) encontraram alterações nas vias apoptóticas, inflamatórias e do estresse em camundongos recém-nascidos infectados com o CHIKV. Uma diminuição da CAT e da peroxiredoxina-6 foi observada, além de alterações em outras proteínas relacionadas ao estresse. Ainda, Joubert *et al.* (2012) descreveram um aumento da produção de EROs em células de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) infectadas pelo CHIKV e que essas espécies reativas estão envolvidas na regulação da autofagia e apoptose induzidos pelo vírus. Assim, esses trabalhos apresentaram evidências de que o estresse oxidativo é um importante fator na patogênese do CHIKV.

O envolvimento do estresse oxidativo em infecções causadas por retrovírus é também bem documentada. Humanos infectados com o HIV estão sob atuação constante do estresse oxidativo, com alterações nas defesas antioxidantes, incluindo alterações no ácido ascórbico, carotenóides, SOD e Glutathione. Assim, níveis séricos elevados de hidroperóxidos e malondialdeído (aldeído mais abundante gerado pelo ataque dos radicais livres aos ácidos

graxos poli-insaturados das membranas celulares) contribuem para a progressão da doença (Peterhans, 1997a; Coaccioli *et al.*, 2010).

Em casos humanos de infecção pelo DENV, diversos estudos apontam alterações no estado redox que contribuem para a patogênese da doença. Além disso, alguns marcadores do dano oxidativo apresentam-se alterados durante as diferentes fases da infecção, fase febril e fase convalescente, podendo funcionar como marcadores da evolução da doença (Gil *et al.*, 2004; Klassen *et al.*, 2004; Seet *et al.*, 2009). Wang e colaboradores (2013), mostraram que a administração de Glutathione exógena pode prevenir o estresse oxidativo e a injúria hepática em modelo animal experimental de DENV-2, chamando atenção para seu uso promissor no tratamento das infecções por esse vírus.

Nas hepatites virais, como aquelas causadas pelo HCV e HBV, a produção de espécies reativas contribui para o aparecimento de carcinoma hepatocelular, um tumor visto depois de anos de inflamação crônica do fígado. Antioxidantes e agentes que diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias podem ser um complemento útil dos antivirais específicos, no tratamento dessas doenças virais (Peterhans, 1997a; Machida *et al.*, 2006; Wang & Weinman, 2006; Abel *et al.*, 2009; Darvesh & Bishayee, 2010; Pal *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo também tem importante papel na patogênese da inflamação pulmonar causada pelo *Respiratory syncytial virus* (RSV). A infecção de células epiteliais das vias aéreas pelo RSV induz a produção de EROs (Casola *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). Em camundongos infectados, o RSV induz estresse oxidativo nos pulmões, e o tratamento antioxidante melhora os sinais clínicos e a inflamação pulmonar (Castro *et al.*, 2006). Em células humanas epiteliais das vias aéreas, foi demonstrado que a infecção pelo RSV aumenta níveis dos produtos de peroxidação lipídica e diminui a expressão das enzimas antioxidantes SOD1, SOD3, CAT e glutathione S-transferase (GST), com ligeiro aumento na SOD2. Além disso, foi verificado aumento na atividade total de SOD e redução de CAT, GPx e GST (Hosakote *et al.*, 2009). Em camundongos BALB/c infectados pelo RSV há uma menor regulação do sistema antioxidante, contribuindo para dano oxidativo pulmonar (Hosakote *et al.*, 2011).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou se a infecção de camundongos BALB/c pelo arbovírus *Caraparu virus* (CARV), membro da família *Bunyaviridae* e importante patógeno de humanos, poderia causar estresse oxidativo e alterar as defesas antioxidantes no fígado de animais infectados, já que o fígado é um sítio ativo da replicação viral. Após a infecção subcutânea dos camundongos, o CARV foi detectado no fígado e a histopatologia

revelou hepatite aguda. Aumento da expressão hepática de TNF- $\alpha$  foi encontrado nos animais infectados. Ainda, a infecção pelo CARV não alterou os biomarcadores de estresse oxidativo, mas aumentou o conteúdo de Glutathione Total e alterou a expressão e atividade das enzimas SOD e CAT (Camini *et al.*, 2014).

Já foi demonstrado também que a infecção em fagócitos pelos vírus influenza e paramyxovirus ativa a geração do ânion superóxido por um mecanismo que envolve a interação entre as glicoproteínas da superfície viral e a membrana plasmática do fagócito (Peterhans, 1997a, b).

A indução da ativação de fagócitos por certos vírus está associada com o estresse oxidativo, não apenas pela liberação de EROs pelas células fagocíticas, mas também pela liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células, como Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (Schwarz, 1996). Citocinas como o TNF- $\alpha$  pode atuar em nível mitocondrial, com potentes efeitos pró-oxidantes, ativando a produção mitocondrial de EROs como parte do seu mecanismo de citotoxicidade. O TNF- $\alpha$  também atua em eventos de sinalização como a liberação do fator de transcrição NF-KB, que por sua vez é translocado do citoplasma para o núcleo da célula induzindo a expressão de genes pró-inflamatórios (Schulze-Osthoff, *et al.* 1992).

Nesse contexto, o perfil de citocinas e quimiocinas pode contribuir para o entendimento da imunopatologia causada por vírus e conseqüentemente, em intervenções terapêuticas (Chow *et al.*, 2011). Vários estudos demonstraram a relação direta entre a infecção por vírus e a indução de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para injúrias celulares (Ng *et al.* 2009; Hoarau *et al.* 2010; Herrero *et al.*, 2011; Nakaya *et al.*, 2012; Hosakote *et al.*, 2012). Esse fato permite sugerir o envolvimento do estresse oxidativo associado ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na patogênese de infecções virais.

Diante das evidências que alterações nas espécies reativas pró-oxidantes e nas defesas antioxidantes ocorrem durante a infecção por vários vírus, nota-se a importância em se estudar o estresse oxidativo e suas diferentes vertentes na patogênese viral. Associado a isso, para o MAYV ainda não há estudos relacionando-o especificamente ao estresse oxidativo. Portanto, torna-se relevante elucidar alguns aspectos relacionados ao *status* redox celular frente à infecção pelo MAYV. A partir desses dados, o conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos na infecção pelo MAYV será expandido e ainda, novas perspectivas se poderão se abrir frente ao uso de substâncias antioxidantes como potencial abordagem farmacológica.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivo Geral

Avaliar o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes em células J774 infectadas pelo *Mayaro virus*.

#### 3.2- Objetivos Específicos

I- Multiplicar e titular o MAYV;

II- Caracterizar a infecção pelo MAYV em células J774:

- Construir uma curva de multiplicação viral;

III- Avaliar o potencial oxidante da infecção pelo MAYV em células J774:

- Medir a produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs);

IV- Avaliar o potencial antioxidante da infecção pelo MAYV em células J774:

- Medir a atividade e expressão gênica das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT);
- Medir os níveis de Glutathione total;

V- Avaliar o estresse oxidativo após a infecção pelo MAYV em células J774:

- Medir os níveis de Malondialdéido (marcador de peroxidação lipídica);

VI- Avaliar o perfil inflamatório da infecção pelo MAYV em células J774:

- Medir a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e MMP-3.

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Multiplicação do MAYV

O MAYV, cepa BeAr20290, foi originalmente isolado de um *pool* de 93 *Haemagogus* spp, capturados no km 87 da rodovia Belém-Brasília em 1960. Essa amostra foi gentilmente cedida pelo professor Maurício Lacerda Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP/SP). Para produção dos estoques, o MAYV foi multiplicado em garrafas médias (182 cm<sup>2</sup>) contendo monocamada de células Vero. A adsorção foi feita adicionando-se 100 µL do MAYV em 2 mL de DMEM (Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco, *Cultilab*, Brasil), a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com homogeneização constante durante 1 hora. Após essa etapa, meio DMEM contendo 1% de Soro Fetal Bovino (SFB, *Cultilab*, Brasil), gentamicina (50µg/ ml), penicilina potássica (200U/ ml) e fungizona (2,5µg/ ml) foi acrescido para um volume final de 25 mL, sendo a garrafa incubada até o efeito citopático (ECP) atingir cerca de 90%. O sobrenadante da infecção celular foi transferido para tubos e centrifugado em centrífuga Sorvall RC-5B rotor SS34 (4°C) por 5min a 5000 rpm. O sobrenadante clarificado foi aliquoteado em microtubos, contendo 100 µL. Esse material foi mantido a -80°C para posterior titulação e uso.

### 4.2- Titulação do MAYV

Células Vero foram cultivadas em placas de seis poços (1x10<sup>6</sup> células/poço) e, após 90% de confluência, foram adicionados a 5 poços 200 µL de diluições seriadas do MAYV, feitas em DMEM 0% SFB, deixando um poço como controle negativo, no qual foram adicionados 200 µL de DMEM 0% SFB. Após 1h de adsorção, com homogeneização constante, o meio foi removido e a cada poço foram adicionados 2 mL de DMEM 2% SFB acrescido de carboximetilcelulose (CMC) a 2%, seguindo nova incubação a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 48 horas, as células foram fixadas em solução 10% de formol por 2h. Após o descarte e lavagem do formol, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta. O título foi expresso pelo número de unidades formadoras de placas (UFP) obtido nas câmaras cujas diluições apresentaram entre 30 e 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para UFP/ mL.

### 4.3- Curva de multiplicação do MAYV em células J774

Para caracterização da curva de multiplicação do MAYV em células J774, foram quantificados o número de partículas de vírus presente exclusivamente no sobrenadante das células e partículas de vírus dentro das células. Para tal, células J774 foram crescidas em meio DMEM alta glicose (*Cultilab*, Brasil), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, *Cultilab*, Brasil), gentamicina (50µg/ ml), penicilina potássica (200U/ ml) e fungizona (2,5µg/ ml). As células aderidas em placas de 6 poços foram infectadas com o MAYV numa multiplicidade de infecção (moi) de 5. Após 1 hora de adsorção, retirou-se o sobrenadante, lavou-se a monocamada celular por duas vezes com PBS 1x e adicionou-se a cada poço 2 mL de DMEM alta glicose 2% SFB. Nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção (hpi) foram determinados:

#### A- TÍTULO DE VÍRUS NO SOBRENADANTE

Alíquotas dos sobrenadantes das células infectadas foram coletadas nos diferentes tempos. Posteriormente, essas alíquotas foram tituladas em células Vero, conforme o item 4.2, e com os resultados obtidos foi traçada uma curva de multiplicação viral.

#### B- TÍTULO DE VÍRUS DENTRO DAS CÉLULAS

Nos diferentes tempos, o sobrenadante das células infectadas foi descartado, a monocamada lavada duas vezes com PBS 1X e as células descoladas com espalhadores tipo “*scrapers*”. Essa suspensão de células foi recolhida em tubos tipo Falcon de 15 mL e centrifugadas a 10.000 rpm por 3 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o “*pellet*” foi congelado e descongelado 2x em freezer -80°C para lise celular. As células lisadas foram ressuscendidas em meio DMEM alta glicose 0% SFB, centrifugadas novamente a 10000 rpm por 3 min para precipitar os debris celulares e o sobrenadante foi usado para titulação em células Vero. Assim foi possível quantificar os vírus presente dentro das células. Com os resultados obtidos, foi traçada uma curva de multiplicação viral.

### 4.4- Dosagem de EROs

A produção de EROs intracelular foi mensurada através do Kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (Invitrogen®), que permite a detecção de EROs intracelular por

fluorescência. A técnica utiliza um marcador fluorogênico (5-ou-6)-carboxy-2',7' dichlorodihydro fluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA), que quando quebrado por esterasas intracelulares não específicas gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as EROs tornando-se fluorescente.

O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços, na qual cerca de  $2,5 \times 10^4$  células foram adicionadas em cada cavidade e deixadas por cerca de 45 min para aderência. Após a aderência, as células foram lavadas 2x com tampão de Solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS – KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , glicose,  $\text{NaHCO}_3$ , NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – PH 7,4) e carregadas com 100  $\mu\text{L}$  da sonda durante 45 min a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , no escuro. Após a incubação, descartou-se o meio e lavou-se 1x com HBSS. Então adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura sem vermelho de fenol nos poços do controle negativo, 100  $\mu\text{L}$  de hidroperóxido *tert*-butil (TBHP - um indutor da produção de ERO) nos poços do controle positivo e 100  $\mu\text{L}$  do MAYV, em uma moi de 5, nos poços destinados à infecção. Em seguida as células foram incubadas em estufa à  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , no escuro.

Após os tempos de 1, 2, 4, 6, 15 e 24 horas foram feitas leituras da intensidade de fluorescência à 485/535 nm (excitação/transmissão). O aparelho utilizado foi o leitor de microplaca tipo VICTOR™ X3 Multilabel (Perkin Elmer), com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5.

#### 4.5- Dosagem da atividade total de SOD

Para essa dosagem foi utilizado o método espectrofotométrico proposto por Marklund (1974), no qual utiliza inibição da auto-oxidação do Pirogalol, que se auto-oxida rapidamente em solução aquosa, produzindo uma coloração amarelada cuja intensidade de cor pode ser determinada. Este processo é dependente da presença de ânions superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ), uma vez que a SOD inibe a auto-oxidação do pirogalol quando catalisa a dismutação desse ânion. Sendo assim, uma unidade da enzima SOD (U SOD) foi definida como a quantidade de enzima que reduz a taxa de auto-oxidação do pirogalol em 50%.

Células J774 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas com o MAYV numa moi de 5. Nos tempos de 6, 15 e 24 hpi os sobrenadantes das placas foram descartados e os poços lavados com PBS 1x. Após a lavagem, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de DMEM alta glicose 0% SFB aos poços, as células foram raspadas com espalhadores tipo

scrapers e centrifugadas a 400 xg por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido com uma solução de homogeneização (20 mM Hepes, pH 7,2; 1 mM EGTA; 210 mM Manitol; 70 mM Sacarose). Após a homogeneização centrifugou-se a 10.000 xg por 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aliquoteado e após a determinação da concentração de proteínas totais em cada amostra pelo método de Bradford, as mesmas foram armazenadas no freezer -80°C até o momento do uso.

#### PROCEDIMENTO DA DOSAGEM:

Utilizou-se um Tampão Fostato (50mM, pH=7), uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), o composto químico Pirogalol (1,2,3-benzenotriol) e Sulfóxido de Dimetilo (DMSO). Esses compostos foram pipetados em uma placa de 96 poços, conforme o quadro abaixo:

##### 1) Pipetagem das amostras:

<b>Tubo</b>	<b>Células (µL)</b>	<b>Tampão Fosfato (µL) (50mM, pH.7,0)</b>	<b>MTT (µL) (1,25 mmol / L)</b>	<b>Pirogalol (µL) (15 mmol / L)</b>
<b>Branco</b>	-	144	6	-
<b>Padrão</b>	-	129	6	6
<b>Amostra</b>	30	99	6	6

2) Após as pipetagens, incubou-se a placa por 5 minutos a 37°C;

3) Após esse tempo, foi pipetado 150 µL de DMSO (PM 78,13) em todos os poços a fim de parar a reação;

4) Fez-se a leitura de absorvância em 570 nm.

5) A atividade de SOD foi expressa como U/ mg de proteína.

#### 4.6- Expressão do RNAm de SOD1, CAT, GAPDH, TNF- $\alpha$ e MMP-3

##### 4.6.1- Extração do RNA total e síntese do cDNA (RT-PCR)

Células J774 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas com o MAYV numa moi de 5. Nos tempos de 6, 15 e 24 os sobrenadantes das placas foram descartados

e os poços lavados com PBS 1x. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), conforme recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Reino Unido) e estocado no freezer -80°C até o uso. Para a síntese do cDNA, 2 µg do RNA total foram usados como molde e as reações feitas para um volume final de 20 µL, utilizando-se a enzima MultiScribe™ (50U/ µL) e oligos randômicos (GeneAmpR RNA PCR, Applied Biosystems, EUA), nas concentrações indicadas pelo fabricante.

#### 4.6.2- PCR em tempo real (qPCR)

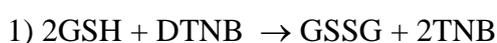
O nível de expressão do RNAm de SOD1, CAT, TNF- $\alpha$ , MMP-3 e GAPDH foi avaliado pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Os cDNAs obtidos pela RT-PCR foram usados como moldes nas reações de PCR em tempo real, que foram realizadas com o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), conforme recomendações do fabricante. As reações foram feitas a 95°C 15 seg e 60°C 1 min, 40 vezes. O aparelho ABI 7500 Real Time PCR Instrument (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado e os valores de  $\Delta C_t$  foram corrigidos pelo valor do gene normalizador GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). O valor  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de cada amostra foi calculado e utilizado para expressão dos resultados. Os oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho foram construídos de acordo com sequências previamente publicadas (Xiong *et al.*, 2010; Qin & Tian, 2011; Roe *et al.*, 2012) e são mostrados na Tabela IV.

**Tabela IV:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado do amplificado e número de acesso no GenBank

Gene	Foward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Amplicon	GenBank
<b>SOD1</b>	CTGGGCGCCTTCCATCCGT	ACTGGTTCACCGCTGCCTTCTG	173 pb	XM_921976
<b>CAT</b>	GTCTCACGTTCCGCAGCTCTGC	CTCCTATTGGGTTCCCGCCTCC	150 pb	NM_009804
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CGCGACGTGGAAGTGGCAGAA	TTGGGGACCGATCACCCCGA	156 pb	NM_013693
<b>MMP-3</b>	GGAAATCCCACATCACCTACAG	TCAATGGCAGAATCCACACTC	76 pb	NM_010809
<b>GAPDH</b>	TGCCAGCCTCGTCCCGTAGA	ACTGTGCCGTTGAATTTGCCGT	197 pb	BC_145810

#### 4.7- Dosagem de Glutathiona Total

O conteúdo de glutathiona total foi determinado em células J774 utilizando o método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico], DTNB – GSSG proposto por Griffith (1980). Este ensaio utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412nm conforme descrito na reação abaixo:



#### PREPARO DA AMOSTRA

As células J774 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/mL) e infectadas (moi 5) ou não (controles). Nos tempos de 6, 15 e 24 hpi os sobrenadantes das placas foram descartados, os poços lavados com PBS 1x e então se adicionou em cada poço 1 mL de PBS. As células foram descoladas dos poços com espalhadores tipo “*scrapers*”, centrifugadas a 600 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e então adicionou-se 120  $\mu\text{L}$  de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA) ao “*pellet*”. Essa suspensão foi congelada e descongelada 2x para lise celular e deixadas por 5 minutos no gelo. Após esse tempo centrifugou-se a 10000 g, por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado no freezer -80°C até o momento do uso.

#### PROCEDIMENTO DA DOSAGEM

Para a determinação de GSH foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da amostra em uma microplaca, em seguida adicionaram-se 150  $\mu\text{L}$  da mistura de trabalho composta por 95 mM de tampão fosfato, pH 7,0, 0,95 mM de EDTA, 48  $\mu\text{M}$  de NADPH, 0,031 mg/ml de DTNB, 0,115 unidades/ mL de glutathiona redutase, e 0,24% de ácido sulfosalicílico. As amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de NADPH 0,16mg/ mL foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA à 412 nm.

As absorbâncias de diluições seriadas de soluções padrão de Glutathiona foram determinadas separadamente para obtenção das curvas de calibração. Após análise de regressão linear, foi

determinado a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar as concentrações em nmoles de Glutaciona total por mL de amostra.

#### 4.8- Dosagem de Malondialdeído

Células J774 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/mL) e infectadas (moi 5) ou não (controles). Nos tempos de 6, 15 e 24 hpi, os sobrenadantes das placas foram descartados, os poços lavados com PBS 1x e as células foram descoladas dos poços com espalhadores tipo *scrapers*. Adicionou-se 350  $\mu$ L de DMEM 0% SFB e centrifugou-se a 400 xg por 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e ressuspendido com 400  $\mu$ L de PBS 1x. Procedeu-se então o congelamento e descongelamento dessas amostras, 3 x para a lise celular. Em seguida, centrifugaram-se as células lisadas a 10.000 xg por 15 min, em temperatura ambiente. Então, os sobrenadantes foram coletados e armazenados no freezer - 80°C para o ensaio de Malondialdeído.

##### 1) Preparo da curva padrão:

Tubos	MDA ( $\mu$ L)	Água destilada ( $\mu$ L)	SDS 8.1% ( $\mu$ L)	Ác. Acético 2,5M pH 3.4 ( $\mu$ L)	TBA 0.8% ( $\mu$ L)
1	3,125	496,875	50	200	250
2	6,25	493,75	50	200	250
3	12,5	487,5	50	200	250
4	25,0	475,0	50	200	250
5	50,0	450,0	50	200	250

##### 2) Pipetagem das amostras:

Tubo	Células ( $\mu$ L)	Água ( $\mu$ L)	SDS 8,1% ( $\mu$ L)	Ác. Acético 2,5M pH 3.4 ( $\mu$ L)	TBA 0.8% ( $\mu$ L)
<b>Amostra</b>	400	0	100	250	250
<b>Branco</b>	-	400	100	250	250

3) Após as pipetagens, incubou-se todos os microtubos por 90 minutos a 95°C;

4) Centrifugou-se por 5 min. a 5000 rpm;

5) Deixou-se esfriar;

- 6) Em seguida, pipetou-se o branco, a curva padrão e as amostras em triplicata em microplaca (96 poços), 250  $\mu\text{L}$  em cada poço.
- 7) Fez-se a leitura no modo fotométrico em 532 nm.
- 8) Cálculos para determinação da concentração de MDA nas amostras.

- Cálculo do Fator de Correção Molecular (FCM) da curva padrão:

$$\text{FCM: } [(0,09375/\text{Abs.1}) + (0,1875/\text{Abs.2}) + (0,375/\text{Abs.3}) + (0,75/\text{Abs.4}) + (1,5/\text{Abs.5})] / 5$$

- Determinação da concentração de MDA nas amostras:

$$\text{TBARS: } (\text{Abs. amostra} \times \text{FCM}) / (\text{quant. de células} \times \text{vol. amostra pipetado}) = \text{nmol de MDA} / 2,5 \times 10^6 \text{ células/mL.}$$

#### 4.9- Análise Estatística

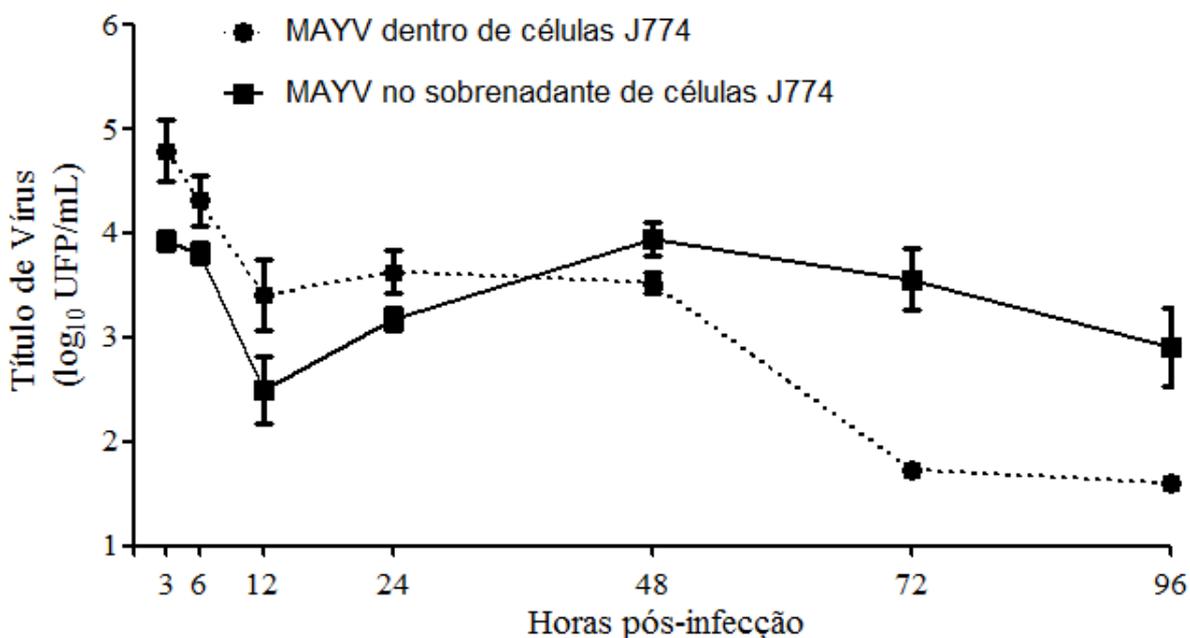
Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism, versão 5.01. De acordo com o teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*), foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos. Foi utilizado o teste “*t*” *Student* para variáveis que apresentaram distribuição normal. As diferenças entre os grupos infectados e controles foram consideradas significantes quando o valor de *p* foi menor ou igual a 0,05, pelo teste t-Student, com \*, \*\* e \*\*\* representando diferenças significativas com  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  and  $p \leq 0.001$ , respectivamente.

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Curva de multiplicação do MAYV em células J774

Para obtenção dos estoques virais (amostras *pool* trabalho), o MAYV foi primeiramente multiplicado e titulado em células Vero, que sabidamente são suscetíveis e permissivas a multiplicação desse vírus. O título obtido foi de  $2,5 \times 10^8$  UFP/ mL.

O próximo passo foi avaliar se as células J774, objeto de estudo desse trabalho, também são susceptíveis e permissivas a multiplicação do MAYV. Para tal, as células foram infectadas com uma moi de 5. Amostras do sobrenadante (isento de células) e do lisado celular (isento de sobrenadante) foram obtidas em diferentes hpi e tituladas em células Vero. Com os resultados foram traçadas duas curvas, uma que reflete a quantidade de vírus produzidos e liberados para o sobrenadante das células e outra que reflete a quantidade de vírus no ambiente intracelular (Figura 8).



**Figura 8: Curva de multiplicação do MAYV em células J774.** Células J774 foram infectadas com o MAYV com uma moi de 5. Nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 hpi os títulos de vírus foram mensurados em amostras obtidas do lisado de células ou do sobrenadante, pelo método da contagem das Unidades Formadoras de Placas, em células Vero. Os títulos foram expressos como log<sub>10</sub> UFP/mL. Titulações foram feitas em quadruplicatas.

Como pode ser observado na Figura 8, as duas curvas mostraram perfis semelhantes. Sabe-se que, as primeiras horas pós-infecção (momento desde a penetração até liberação de novas partículas) são definidas como período de eclipse, momento no qual os vírus encontram-se dentro da célula e nenhuma partícula infecciosa produzida pela multiplicação viral é detectada no ambiente extracelular. Como resultado, nenhum vírus infeccioso pode ser detectado nesses tempos iniciais. Esse período de eclipse pode variar de 3 a 12 horas, dependendo da família de vírus (Dulbecco *et al.*, 1953).

No que se refere ao título do MAYV no sobrenadante de células infectadas, foi detectado um grande número de partículas infecciosas nos tempos precoces da infecção, 3 e 6 horas, com médias de títulos de  $8 \times 10^3$  UFP/mL e  $6 \times 10^3$  UFP/mL, respectivamente. Uma possível explicação é que os vírus infecciosos detectados nesses tempos precoces não refletem a progênie viral produzida pela infecção, mas são partículas infecciosas que não adsorveram à superfície celular. Esse evento pode ter sido favorecido, uma vez que o inóculo de vírus adicionado à monocamada de células foi grande (moy de 5, ou seja, 5 vírions para cada célula), favorecendo um excesso de partículas virais que não atingiram o ambiente intracelular.

Da mesma forma, com relação ao título de vírus dentro das células nos tempos de 3 e 6 horas, também foram detectadas grandes quantidades de partículas infecciosas, e essas estavam presentes em maior quantidade comparando ao título do sobrenadante (médias de títulos de  $7 \times 10^4$  UFP/mL e  $3 \times 10^4$  UFP/mL, respectivamente). Assim, esses vírus detectados no meio intracelular nessas primeiras 3-6 horas correspondem aos que conseguiram penetrar nas células, mas ainda nenhuma progênie viral foi formada.

A partir de 12 hpi, observou-se um decréscimo no título de vírus em ambos os casos (dentro e fora da célula). Para os vírus presentes no sobrenadante, esse decréscimo no título (média de  $5 \times 10^2$  UFP/mL) ocorreu possivelmente devido a perda de infectividade das partículas que não conseguiram atingir o ambiente intracelular e que permaneceram no sobrenadante. Para os vírus presentes no interior das células, essa diminuição do título (média de  $5 \times 10^3$  UFP/mL) pode ter ocorrido uma vez que, seguida a penetração, as partículas são desnudas e posteriormente seguem para as etapas de biossíntese, replicação do genoma e morfogênese. Assim, novas partículas virais infecciosas não são detectadas (ou se são, apenas em pequenas quantidades) até que o ciclo replicativo se complete com a etapa de maturação/liberação.

Observa-se, com o aumento nos títulos de vírus, em ambas as curvas, que a progênie viral já pode ser detectada no tempo de 24 horas. No sobrenadante e no interior das células, as médias

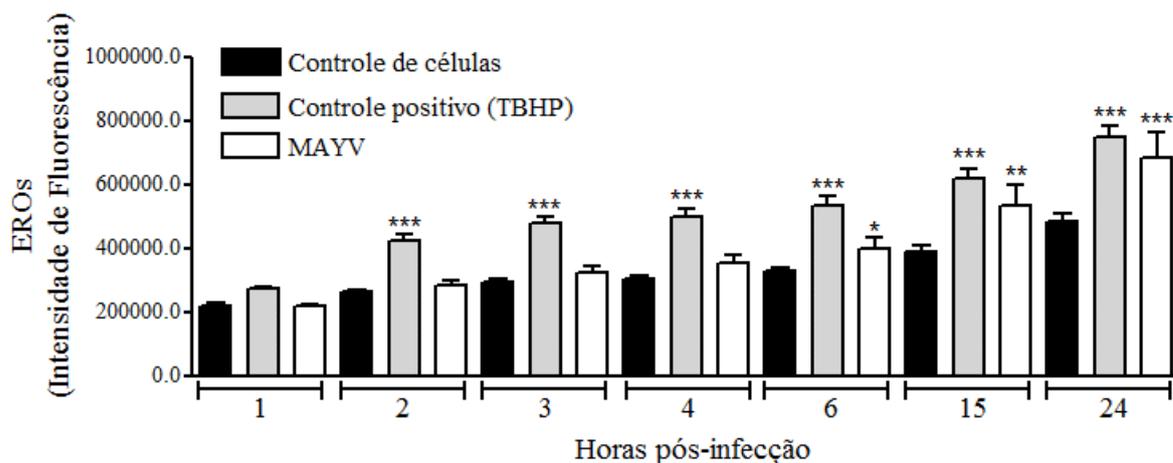
de títulos foram de  $2 \times 10^3$  UFP/mL e  $5 \times 10^3$  UFP/mL, respectivamente. O pico de produção de vírus é observado no tempo de 48 horas, no sobrenadante das células, com média de títulos de  $1 \times 10^4$  UFP/mL. Nesse mesmo tempo, o título de vírus no ambiente intracelular começa a cair, mostrando que as partículas novas e maduras já foram liberadas das células. Portanto, a liberação exponencial de vírus no sobrenadante reflete seu estágio de multiplicação intracelular.

A partir de 72 hpi, os títulos de vírus no ambiente intracelular decaem vertiginosamente, e isso se dá uma vez que, nesses tempos, a monocamada de células apresenta 100% de morte. De forma semelhante, os vírus presentes no sobrenadante, nesses tempos tardios, perdem sua infecciosidade, uma vez que não encontram novas células hospedeiras viáveis para reiniciarem seus ciclos replicativos.

Assim, esses resultados indicam que os macrófagos J774 são susceptíveis à multiplicação pelo MAYV, e que esse vírus é capaz de se multiplicar nessas células. A partir de então, os demais experimentos foram realizados em células J774 controles ou infectadas pelo MAYV, em uma *moi* de 5.

## 5.2- Avaliação da produção de EROs

Para determinar se o MAYV é capaz de induzir a formação de EROs, avaliou-se a produção dessas espécies em células infectadas ou não, em diferentes tempos. A substância hidroperóxido *tert*-butil (TBHP) foi utilizada como controle positivo desde que sabidamente induz a formação de ERO. A Figura 9 mostra que, em relação às células controles, as células infectadas com o MAYV induziram uma maior produção de EROs nos tempos de 6, 15 e 24 horas. A partir de então, os tempos escolhidos para os demais ensaios foram 6, 15 e 24 horas.



**Figura 9: MAYV induz a produção de EROs em células J774.** Células J774 foram tratadas com a sonda 5-(e-6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA) durante 45 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com TBHP ou infectadas com o MAYV numa moi de 5. Os controles de células receberam apenas meio de cultura sem vermelho de fenol. Em diferentes hpi, a fluorescência das amostras foi medida. Dados são expressos em porcentagens relativas e expressos como a média ± desvio padrão ( $n = 8$  por grupo), \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$  em comparação às células controles (teste t-Student).

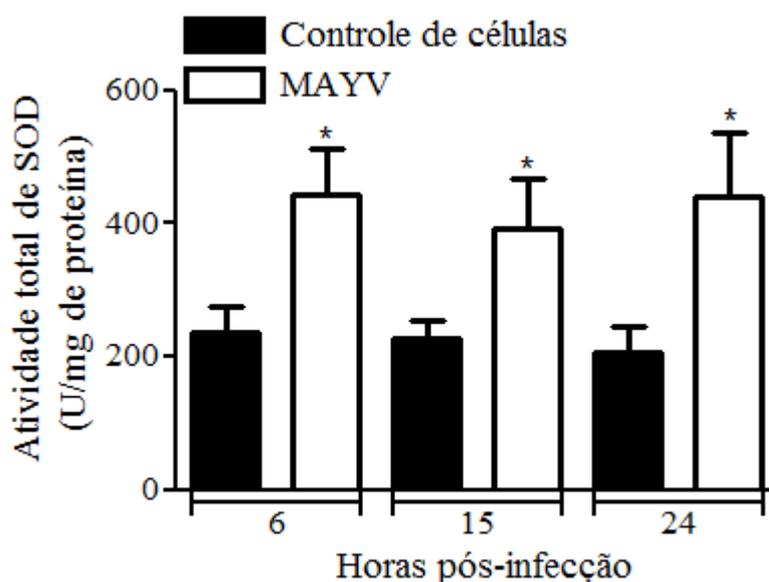
### 5.3- Avaliação das enzimas antioxidantes SOD e CAT

Uma vez que encontramos alteração no *status* oxidante celular após infecção pelo MAYV (aumento na produção de EROs), nossa próxima abordagem foi avaliar se as principais enzimas antioxidantes celulares, SOD e CAT, poderiam também estar alteradas após a infecção. Para tal, avaliamos a atividade total de SOD e a expressão gênica de SOD-1 (isoforma citoplasmática e mais abundante) e CAT. Os experimentos referentes a atividade de CAT ainda não foram concluídos e fazem parte das perspectivas desse trabalho.

#### 5.3.1- Atividade total de SOD

Alterações nos níveis da enzima SOD têm sido associadas com muitas doenças virais, uma vez que esta enzima funciona como um importante mecanismo de defesa contra as EROs produzidas. Portanto, alterações na expressão e/ou atividade dessa enzima podem estar ligadas a patogênese desencadeada pelos vírus.

Uma vez que observamos que o MAYV aumenta a produção de EROs e sabendo-se que a enzima SOD é a primeira linha do sistema de defesa antioxidante (converte a EROs primária  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ ), avaliamos a atividade total dessa enzima em células controles e infectadas com o MAYV, nos mesmos tempos em que observamos um aumento das EROs, ou seja, 6, 15 e 24 horas. Na Figura 10 é possível observar que, em todos os tempos analisados, houve um aumento da atividade total de SOD nas células infectadas com o MAYV, em relação às células controles.

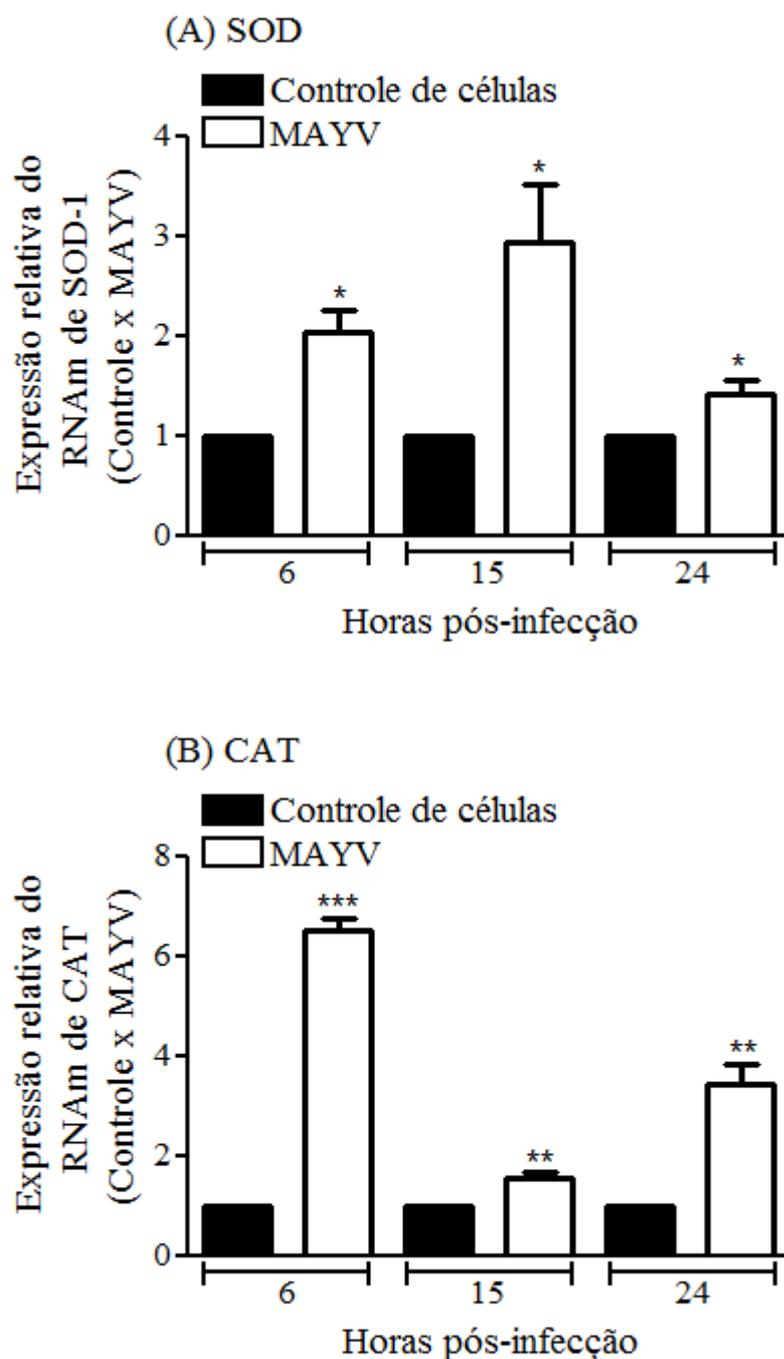


**Figura 10: MAYV aumenta a atividade da enzima Superóxido Dismutase em células J774.** Células J774 foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi foi feita a dosagem da atividade da enzima SOD. Resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$  por grupo), onde  $*p \leq 0,05$  em comparação às células controles (teste t-Student).

### 5.3.2- Expressão do RNAm de SOD-1 e CAT

Uma vez que a infecção pelo MAYV causou uma alteração na atividade da enzima SOD, nosso próximo passo foi verificar se a alteração observada na atividade dessa enzima poderia ter ocorrido devido a uma alteração na expressão do seu RNAm. Apesar de não sabermos ainda como se comporta a atividade da CAT após infecção pelo MAYV (experimentos em andamento), também avaliamos se a expressão gênica dessa enzima poderia estar alterada após infecção por esse vírus.

A Figura 11 mostra que houve um aumento na expressão do RNAm de SOD1 (A) e CAT (B) nas células infectadas com o MAYV, em todos os tempos analisados.

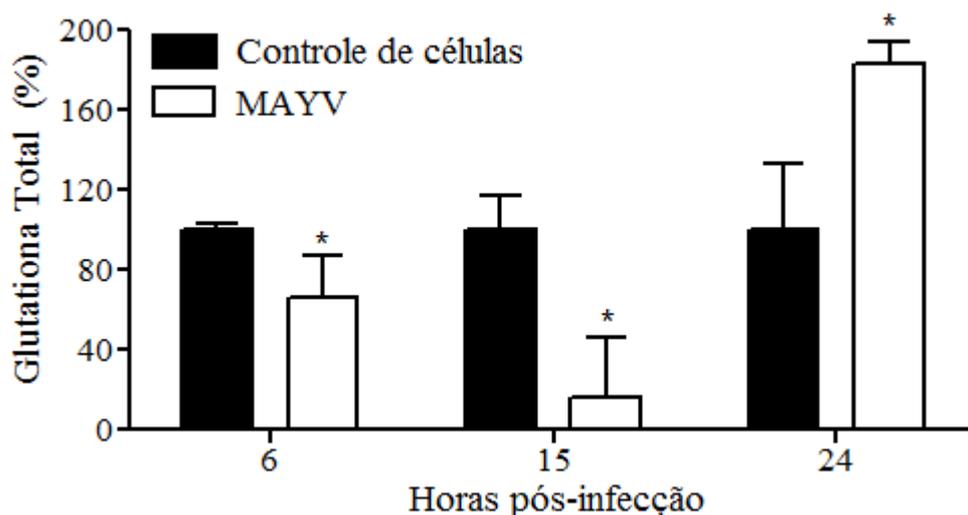


**Figura 11: MAYV altera a expressão do RNAm de SOD1 e CAT em células J774.** Células J774 foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi o RNA total foi extraído. A expressão dos RNAm foi avaliada por RT-qPCR e os valores normalizados pela expressão de GAPDH. (A) Expressão relativa de RNAm de SOD1. (B) Expressão relativa de RNAm de CAT. Resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$  por grupo), onde  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$  e  $***p \leq 0,001$  em comparação às células controles (teste t-Student).

#### 5.4- Avaliação de Glutathiona total

A Glutathiona se apresenta em mais de 98% do seu total como glutathiona reduzida (GSH) e o restante na forma oxidada (GSSG). Quando há um aumento de EROs, a GSH é oxidada a GSSG, pela enzima Glutathiona peroxidase (GP), numa tentativa de detoxificar tais espécies e restaurar a homeostase celular, evitando assim o estresse oxidativo. Assim, sabendo-se que a Glutathiona é uma das principais substâncias envolvidas no controle do estado redox, avaliou-se também o seu conteúdo nas células infectadas ou não com o MAYV.

Como pode ser observado na Figura 12 houve uma diminuição no conteúdo de Glutathiona nas células infectadas pelo MAYV nos tempos de 6 e 15 hpi, em relação às células controles. Por sua vez, o conteúdo de Glutathiona aumentou nas células infectadas, no tempo de 24 horas.



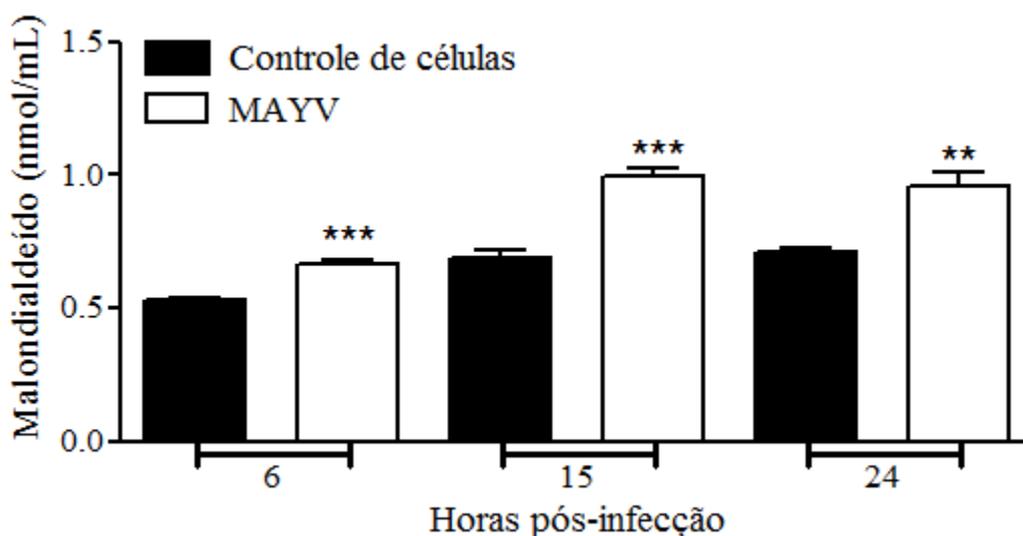
**Figura 12: MAYV altera o conteúdo de Glutathiona Total em células J774.** Células J774 foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi foi feita a dosagem de Glutathiona total. Dados são expressos em porcentagens relativas e expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$  por grupo), \*  $p \leq 0,05$  em comparação às células controles (teste t-Student).

### 5.5- Análise do biomarcador de estresse oxidativo Malondialdeído

A lipoperoxidação decorrente do ataque das EROs aos lipídeos de membrana talvez se constitua o evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. Assim, níveis elevados de Hidroperóxidos e Malondialdeído (aldeído mais abundante gerado pelo ataque dos radicais livres aos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares) contribuem para a lesão celular e progressão de muitas doenças. Dessa forma, a dosagem de Malondialdeído (MDA) é um eficiente biomarcador indireto do estresse oxidativo.

Uma vez que observamos que a infecção pelo MAYV aumenta os níveis de EROs e altera as defesas antioxidantes, nossa próxima abordagem foi avaliar se esse desequilíbrio no *status* redox celular poderia culminar com o estresse oxidativo. Para tanto, medimos os níveis de MDA em células controles e infectadas com o MAYV, nos tempos de 6, 15 e 24 horas.

Como pode se observar na Figura 13, houve um aumento de MDA nas células infectadas com o MAYV, nos diferentes tempos, mostrando assim que a infecção pelo MAYV causou dano oxidativo em células J774.



**Figura 13: MAYV induz dano oxidativo em células J774.** Células J774 foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi foi feita a dosagem de Malondialdeído (MDA), um biomarcador de estresse oxidativo. Resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$  por grupo), onde  $**p \leq 0,01$  e  $***p \leq 0,001$  em comparação às células controles (teste t-Student).

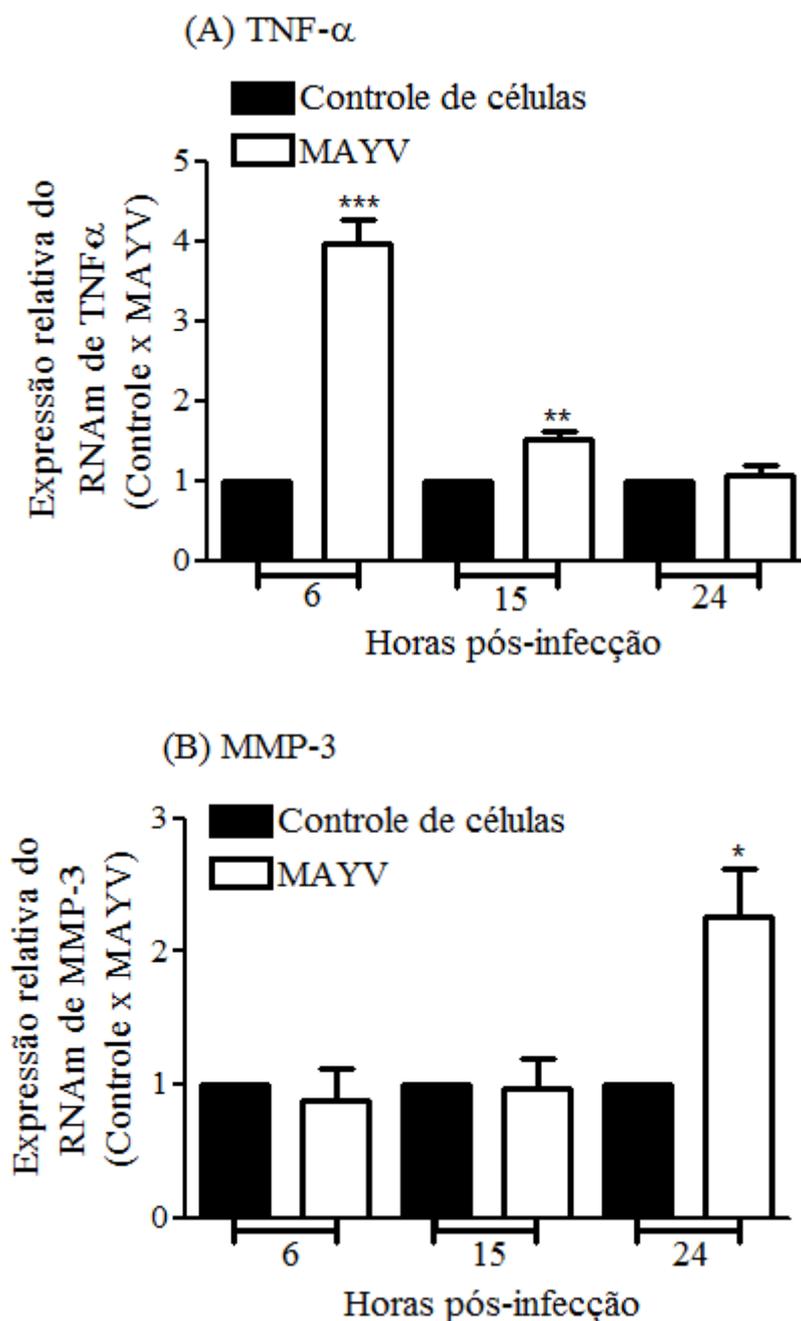
### 5.6- Avaliação da expressão gênica de TNF- $\alpha$ e MMP-3

O TNF- $\alpha$  é uma adipocitocina envolvida no processo de inflamação sistêmica, sendo essencial na promoção da ativação de células do sistema imune, que participam da resposta pró-inflamatória frente a estímulos provenientes de gentes infecciosos. Ainda, como parte do seu mecanismo de citotoxicidade, o TNF- $\alpha$  pode atuar nas mitocôndrias, ativando a produção de mais EROs. Assim, uma vez ativada, essa citocina pode causar danos teciduais, e a avaliação do seu perfil de expressão pode contribuir para o entendimento da imunopatologia causada por vírus.

Aliado a isso, sabe-se que, nos casos de pacientes infectados por certos *Alphavirus*, os macrófagos assumem importante papel nos sintomas crônicos da doença desde que são capazes de secretar diferentes mediadores inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$  e Metaloproteinases de Matriz (MMPs). As MMPs são enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais, facilitam a entrada de células inflamatórias nos tecidos alvo. Portanto, o papel das MMPs no desenvolvimento da artrite induzida por *Alphavirus* tem sido investigado.

Dessa forma, avaliamos por RT-qPCR a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e MMP-3 em células infectadas pelo MAYV, nos tempos de 6, 15 e 24 horas. Vale a pena ressaltar que são descritas 30 tipos diferentes de MMPs humanas, de acordo com sua especificidade de substrato e homologia. Escolhemos inicialmente avaliar a expressão da MMP-3 uma vez que estudos prévios mostraram que essa enzima é uma das que se encontra alterada na infecção pelo alfavírus SINV (Assunção-Miranda *et al.*, 2013). A MMP-3 possui como substratos: fibronectina, laminina, elastina, proteoglicana e colágeno VI, V, IX, X, podendo também estimular a produção de outras MMPs.

Como pode ser visto na Figura 14(A), houve um aumento na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  nas células infectadas pelo MAYV, nos tempos de 6 e 15 hpi. No tempo de 24 horas, a expressão dessa citocina nas células infectadas retornou ao nível do controle de células. Na Figura 14(B), nota-se um aumento na expressão do RNAm de MMP-3 nas células infectadas pelo MAYV, no tempo de 24 horas. Nos demais tempos não houve alteração.



**Figura 14: MAYV altera a expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  e MMP-3 em células J774.** Células J774 foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi o RNA total foi extraído. A expressão dos RNAm foi avaliada por RT-qPCR e os valores normalizados pela expressão de GAPDH. (A) Expressão relativa de RNAm de TNF- $\alpha$ . (B) Expressão relativa de RNAm de MMP-3. Resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$  por grupo), onde  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$  e  $***p \leq 0,001$  em comparação às células controles (teste t-Student).

## 6- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os *Alphavirus* foram alguns dos primeiros arbovírus isolados e caracterizados, sendo globalmente distribuídos e responsáveis por milhões de casos de doenças em humanos todos os anos (Shope, 1980; Gould *et al.*, 2010). Dentre os *Alphavirus* de grande importância, destaca-se o MAYV, agente causador da Febre Mayaro. A Febre Mayaro acomete milhares de pessoas em países das Américas Central e do Sul (Halsey *et al.*, 2013). No Brasil, o MAYV foi isolado pela primeira vez em 1955 de trabalhadores no Estado do Pará (Aitken *et al.*, 1960). Desde então, o MAYV tem causado surtos e epidemias nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste. Até o momento não existe evidência ou dados sobre a presença do MAYV nas regiões Sul e Sudeste (Mota *et al.*, 2015).

Acredita-se que o real número de casos de Febre Mayaro no Brasil é subestimado devido a vigilância inadequada e a falta de diagnóstico específico (Forshey *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2015). Um estudo recente realizado em Sinop, no Mato Grosso, mostrou que, dentre 200 amostras de soro de pacientes febris com suspeita clínica de dengue, 40 foram positivas para a presença de DENV e 6 para MAYV, chamando a atenção mais uma vez para o caráter negligenciado dessa arbovirose no Brasil (Vieira *et al.*, 2015).

Apesar de sua relevância em termos de saúde pública, muitas características epidemiológicas e patogênicas da infecção pelo MAYV permanecem incompreendidas. Alguns estudos na literatura descrevem casos isolados ou surtos de doença em humanos; outros mostraram a evidência da circulação do vírus em certas populações por meio da pesquisa de anticorpos. Assim, estudos que busquem melhor entender as respostas celulares desencadeadas pela infecção pelo MAYV podem auxiliar na compreensão da patogenicidade desse vírus. No cenário brasileiro atual, com a emergência dos arbovírus CHIKV e ZIKV, torna-se cada vez mais relevante o estudo de viroses ainda não devidamente caracterizadas.

Nesse contexto, o objetivo principal desse trabalho foi tentar compreender a resposta celular frente à infecção pelo MAYV, enfocando o estado redox e a infecção. Para tal, avaliamos parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes em macrófagos infectados pelo MAYV, que sabidamente são células envolvidas na patogênese dos alfavírus. Ainda, avaliamos se a infecção pelo MAYV poderia resultar em estresse oxidativo.

O primeiro objetivo foi avaliar se macrófagos murinos da linhagem J774, objeto de estudo deste trabalho, são susceptíveis e permissivos à multiplicação do MAYV. Para isso,

construímos duas curvas de multiplicação viral, uma que reflete a progênie de vírus produzida pela célula e liberada para o ambiente externo, outra que detecta partículas infecciosas dentro da célula (Figura 8). As duas curvas obtidas tiveram perfis semelhantes. Ainda, uma multiplicação de vírus intracelular foi detectada, desde que observamos a liberação de vírus no sobrenadante das células, nos tempos de 24 e 48 hpi. Esses resultados indicam que os macrófagos J774 são susceptíveis à multiplicação pelo MAYV.

Nosso próximo passo foi verificar a produção das EROs por essas células frente à infecção viral. Nas células infectadas com MAYV houve uma maior produção de EROs nos tempos de 6, 15 e 24 horas, como mostra a Figura 9. A produção de EROs também já foi observada nas infecções por vários outros vírus, tais como *Dengue virus*, *Human Immunodeficiency virus*, *Influenza virus*, *Respiratory syncytial virus*, *Chikungunya virus* e *Hepatitis C virus* (Hosakote *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2010; Joubert *et al.*, 2012; Olagnier *et al.*, 2014; Reshi *et al.*, 2014; Ivanov *et al.*, 2015). Assim, esse achado indicou uma possível desregulação no balanço redox celular após infecção pelo MAYV.

Sabe-se que as EROs estão intimamente envolvidas na regulação do metabolismo e na fisiologia celular, o que é muito relevante no contexto das infecções pelos vírus, os quais dependem dos mecanismos de biossíntese das células do hospedeiro. Assim, baixos níveis de EROs ativam a proliferação celular e a maioria dos vírus multiplica-se melhor em células que estão proliferando. No entanto, com o progresso da infecção, mais EROs são formadas a fim de conter a multiplicação viral, e, caso não haja uma efetiva resposta antioxidante, o excesso de EROs pode culminar com o estresse oxidativo e seus efeitos tóxicos para o hospedeiro (Peterhans, 1997a, b).

Dessa forma, nossa próxima pergunta foi se a infecção pelo MAYV poderia também alterar o estado antioxidante das células, na tentativa de neutralizar as EROs. Para respondê-la, avaliamos alguns dos principais antioxidantes celulares, como as enzimas SOD e CAT e a Glutathiona.

Sabe-se que SOD age por um mecanismo de dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), produzindo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Assim, essa enzima desempenha um papel fundamental no equilíbrio da concentração de EROs dentro da célula (Perry *et al.*, 2010). Portanto, analisamos se a infecção pelo MAYV altera a atividade total de SOD e a expressão do RNAm de SOD-1, que é a isoforma mais abundante. Como observado nas Figuras 10 e

11(A), níveis aumentados da atividade total de SOD e da expressão gênica de SOD-1 foram encontrados em células J774 infectadas com o MAYV, nos diferentes tempos (6, 15 e 24 horas).

Alterações nos níveis de SOD têm sido encontradas em algumas doenças virais, como as causadas pelo HCV, vírus influenza, HIV, DENV, RSV, VSV, SINV, dentre outras. Yoshinaka e colaboradores (1999) demonstraram que em células MRC-5 persistentemente infectadas com o *Sindbis virus* (SINV), um outro *Alphavirus*, a MnSOD (ou SOD-2) acumulou-se em grandes quantidades nas células. Ainda, esses mesmos autores mostraram que, quando essa enzima é superexpressa em células Vero, rapidamente sucumbem à infecção pelo SINV e 20% das células infectadas sobreviveram por um período maior, mais de um mês. Assim, esse trabalho sugere que, fatores celulares que regulam a homeostase oxidativa são capazes de determinar o efeito da infecção pelo SINV, se lítico ou persistente; ainda, chama a atenção para a importância do estresse oxidativo na infecção pelos alfavírus.

Em um outro estudo feito na tentativa de correlacionar o estresse oxidativo com a apoptose induzida por vírus, níveis aumentados da atividade total de SOD foram encontrados em células Vero infectadas com o *Vesicular stomatitis virus* (VSV), em diferentes tempos (2, 4, 6 e 8 hpi) (Riva *et al.*, 2006). Nesse mesmo estudo, a infecção pelo VSV causou estresse oxidativo, observado pelo aumento nos níveis de peroxidação lipídica das células.

Ainda, resultados similares ao nosso estudo foram encontrados por Hosakote e colaboradores (2009), no qual verificaram aumento na atividade total de SOD em linhagem de células epiteliais humanas de vias aéreas após infecção pelo *Respiratory syncytial virus* (RSV). Ainda nesse estudo, a atividade de CAT e GPx necessárias para desintoxicar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela SOD, diminuíram após a infecção por RSV, e danos celulares relacionados ao excesso de EROs foi observado. Isso permitiu sugerir que o aumento da atividade da enzima SOD em resposta à infecção por RSV não foi suficiente para modular a sinalização mediada por EROs.

Um outro estudo avaliou parâmetros redox no soro de 22 pacientes com infecção aguda por DENV. Níveis aumentados de SOD e de marcadores de peroxidação lipídica foram encontrados, sugerindo que alterações no *status* redox celular e consequente estresse oxidativo podem ter um papel na patogênese do DENV (Gil *et al.*, 2004).

Por outro lado, contrastando com nossos resultados, estudos mostram que em algumas infecções virais ocorre uma diminuição nos níveis de SOD. Por exemplo, Hosakote e colaboradores (2011) mostraram que na infecção pelo RSV, houve redução na expressão e atividade de SOD-1 em pulmões de camundongos e nas vias aéreas de crianças com

bronquiolite severa, e que o tratamento com antioxidantes melhorou a progressão da doença. Ainda, um estudo demonstrou uma diminuição na atividade de SOD em diferentes linhagens de células (B95-8, Rajii e LCL C1) infectadas com o Epstein-Barr virus (EBV), 48 hpi (Gargouri *et al.*, 2009). Por fim, Narayanan e colaboradores (2011) mostraram que a infecção de células epiteliais de pulmão humano pelo *Rift Valley fever virus* (RVFV), um phlebovírus da família *Bunyaviridae*, provocou uma diminuição da SOD1 e consequente estresse oxidativo. Assim, sugerimos que essas alterações na SOD poderiam ser induzidas pela infecção viral em si ou devido a uma efetiva resposta celular antiviral, uma vez que a redução dessa enzima não é um fator benéfico para o vírus.

No nosso estudo, o aumento da SOD observado após infecção de células J774 pelo MAYV pode ter ocorrido numa tentativa de proteção dos alvos celulares contra o ataque do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), resguardando a célula dos efeitos danosos que essa ERO pode causar. Contudo, a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pela SOD produz o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que se não for inativado, pode formar o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, que é considerado a espécie reativa mais potente em sistemas biológicos. Assim, a inativação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular ocorre através da ação da CAT e da Glutathione.

Nosso próximo passo então foi avaliar os níveis da CAT em células J774 infectadas com o MAYV. Até o momento avaliamos a expressão gênica dessa enzima. Como mostra a Figura 11(B), houve um aumento na expressão do RNAm de CAT nas células infectadas com o MAYV, nos diferentes tempos analisados. Com esse aumento observado na expressão do RNAm de CAT, podemos hipotetizar que também tenha ocorrido um aumento na quantidade e atividade dessa proteína na célula. No entanto, estudos complementares deverão ser feitos para comprovar essa hipótese.

Assim como para SOD, níveis alterados de CAT podem ser encontrados em infecções virais. Duygu e colaboradores (2012) encontraram níveis elevados de CAT em pacientes com hepatite B crônica e aumento no estresse oxidativo associado à infecção por esse vírus. Por outro lado, Hosakote e colaboradores (2011) mostraram que a infecção pelo RSV reduziu a expressão e atividade da CAT em pulmões de camundongos e nas vias aéreas de crianças com bronquiolite severa, colaborando para o estresse oxidativo observado no estudo. Ainda, Yahya e colaboradores (2013) demonstraram que pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV),

com hepatocarcinoma hepático, apresentaram níveis séricos de CAT mais baixos que seus controles e um aumento das espécies reativas.

Dessa forma, observamos, de maneira geral, aumento de SOD e CAT em células J774 infectadas pelo MAYV. A razão SOD/CAT é de extrema importância, visto que, uma vez que a SOD está aumentada, produz excesso de  $H_2O_2$ , sendo necessário também um aumento na CAT para converter o  $H_2O_2$  em  $H_2O$ . Esse seria um possível mecanismo de proteção contra o excesso de EROs produzido na infecção pelo MAYV. No entanto, como o sistema da Glutathione é também muito importante na regulação celular redox, pois assim como a CAT, reduz o  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , avaliamos os níveis de Glutathione total nas células infectadas pelo MAYV. Como mostra a Figura 12, houve uma diminuição no conteúdo intracelular de Glutathione nas células infectadas com o MAYV, nos tempos 6 e 15 hpi. Por outro lado, foi observado um aumento de Glutathione no tempo de 24 hpi.

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da Glutathione no contexto das infecções virais. Tian e colaboradores (2010) demonstraram que a infecção pelo DENV-2 diminuiu significativamente os níveis da Glutathione total em células HepG2. Ainda, eles demonstraram que o tratamento suplementar com a forma exógena dessa substância não só inibe o estresse oxidativo, como também diminuiu a produção de novas partículas virais. Mais tarde, Wang e colaboradores (2013) mostraram que a administração de Glutathione exógena pode prevenir o estresse oxidativo e a injúria hepática em modelo animal experimental de DENV-2, chamando atenção para seu uso promissor no tratamento das infecções por esse vírus. Hosakote e colaboradores (2009) mostraram que após a infecção pelo RSV, em modelo celular, os níveis de Glutathione total reduzem com o progresso da infecção, sobretudo, a partir de 24 hpi. Ainda, Dhanwani e colaboradores (2012), ao infectar células de neuroblastoma humano com *Chikungunya virus* (CHIKV), um *Alphavirus* como o MAYV, encontraram uma redução no nível de Glutathione intracelular e um aumento na peroxidação lipídica das células infectadas, o que contribuiu para o envolvimento do estresse oxidativo na infecção pelo CHIKV.

Dessa forma, uma vez que observamos que o MAYV foi capaz de induzir grandes quantidades de EROs em células J774, e também alterou componentes importantes do sistema de defesa antioxidante, nossa próxima abordagem foi avaliar se essa ruptura no estado redox celular poderia culminar com o estresse oxidativo. Para tal, medimos os níveis de Malondialdeído, que é o aldeído mais abundante gerado pelo ataque dos radicais livres aos

ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, e, portanto, funciona como um biomarcador de estresse oxidativo.

Como mostra a Figura 13, níveis aumentados de MDA foram encontrados nas células J774 infectadas com o MAYV, nos diferentes tempos (6, 15 e 24 horas). Sabe-se que, o efeito que as EROs terão sobre a célula depende não só da quantidade dessas espécies, mas também do tempo em que as células estarão expostas à elas. Desse modo, o fato dos níveis de MDA apresentarem-se elevados nos mesmos tempos em que houve um aumento intracelular de EROs, indica que a quantidade dessas espécies formadas e o tempo que elas permaneceram nas células foram suficientes para causar danos oxidativo às membranas celulares.

Em resumo, nosso estudo demonstrou que a infecção pelo MAYV resultou em um aumento da produção de EROs, dos níveis de MDA e redução dos níveis de Glutathione Total. Esses dados fornecem uma forte evidência de estabelecimento de dano oxidativo em células J774 infectadas com MAYV. Interessantemente, também ocorreu aumento de SOD e CAT em todos os tempos pós infecção, possivelmente como um mecanismo de proteção e regulação em resposta à infecção. Além disso, em células infectadas com MAYV houve aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e MMP-3, indicando possível alteração no perfil inflamatório.

Ainda, reforçando essa hipótese, sabe-se que células do sistema imune, como os macrófagos aqui utilizados, geralmente requerem uma concentração de antioxidantes maior que outras células para manter o equilíbrio redox e preservar sua integridade e função (Reshi *et al.*, 2014).

Sabe-se que o estresse oxidativo é fator chave na patogênese de muitos vírus, dentre eles, vírus RNA. O estresse oxidativo induzido após infecção por vírus RNA pode contribuir em diversos aspectos para a patogênese da doença, incluindo apoptose, perda de função imune, replicação viral e resposta inflamatória (Reshi *et al.*, 2014). Assim, para avaliar em parte a resposta inflamatória na infecção pelo MAYV, nós medimos a expressão gênica da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ . Como pode ser observado na Figura 14(A), houve um aumento na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  nas células infectadas com o MAYV nos tempos de 6 e 15 hpi.

Estudos prévios já correlacionaram a elevada concentração de citocinas pró-inflamatórias na infecção por *Alphavirus* (Hoarau *et al.*, 2010; Chow *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2011; Way *et al.*, 2002). Ainda, Santiago e colaboradores (2015), em um estudo longitudinal, ao analisar a resposta imunológica de humanos com infecção confirmada de MAYV, observaram aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, inclusive TNF- $\alpha$ , em indivíduos com artralgia

persistente provocada pela infecção em comparação com o grupo controle. Adicionalmente, Assunção-Miranda e colaboradores (2010) relatam que a infecção pelo SINV induz um aumento na secreção de TNF- $\alpha$  em macrófagos humanos, 24 e 48 hpi.

Esse trabalho corrobora com nossos resultados, desde que, nas células infectadas pelo MAYV, nos tempos de 6 e 15 horas, houve uma diminuição nos níveis de Glutathione e um aumento na expressão gênica de TNF- $\alpha$ . Por outro lado, no tempo de 24 hpi, houve um aumento no conteúdo de Glutathione e os níveis de expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  se igualaram aos das células controles. Ou seja, um aumento de Glutathione intracelular 24 horas após infecção pelo MAYV possivelmente contribuiu para manter níveis basais de TNF- $\alpha$ .

Uma vez que houve um aumento na expressão gênica de TNF- $\alpha$  na infecção pelo MAYV (nos tempos 6 e 15 hpi) e devido ao fato do TNF- $\alpha$  estimular a produção de Metaloproteinases (MMPs), analisamos o possível envolvimento da infecção pelo MAYV na alteração da expressão da Metaloproteinase 3 (MMP-3). As MMPs são secretadas por uma grande variedade de células, incluindo células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos), células epiteliais e fibroblastos, em resposta a um estímulo inflamatório (Murphy & Docherty, 1992). Níveis aumentados dessas enzimas são encontrados em doenças que acometem articulações, como a artrite reumatoide, onde exercem um papel na degradação da matriz extracelular articular.

Como pode ser observado na Figura 14(B), houve um aumento na expressão gênica da MMP-3 nas células infectadas pelo MAYV, 24 hpi. Sabe-se que o controle da expressão gênica das MMPs ocorre em resposta a estímulos de citocinas (IL-1, IL-4, IL-6 e TNF $\alpha$ ), EROs, óxido nítrico (NO), hormônios e fatores de crescimento. Estes se ligam a receptores na superfície da célula, desencadeando cascatas de sinalização intracelulares que, por sua vez, ativam fatores de transcrição que se ligam às regiões presente no promotor de genes de diferentes MMPs. Os macrófagos são umas das principais células responsáveis pela produção de MMPs em resposta a esses estímulos, e, uma vez ativados, liberam-as para o meio extracelular (Birkedal-Hansen et al., 1993).

Corroborando com nossos dados, Assunção-Miranda e colaboradores (2010) descreveram que a infecção pelo SINV induziu a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, e esse evento foi seguido pelo aumento da expressão de metaloproteinases de matriz, dentre elas a MMP-3 (aumentada em 24 hpi). Ainda, essa alteração foi associada aos danos articulares presentes na infecção por esse vírus. Assim, pode-se sugerir nesse estudo que, o fato do MAYV promover aumento de EROs e TNF $\alpha$ , poderia ter contribuído para o aumento da expressão de

MMP-3. Por conseguinte, níveis elevados MMP-3 após a infecção pelo MAYV podem estar associados à degradação da matriz extracelular relacionada a artrite induzida pela infecção.

A proposta de que infecções virais e progressão de doenças estejam envolvidas com equilíbrio redox intracelular está sendo amplamente estudada para vários arbovírus (Narayanan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Claus *et al.*, 2013; Camini *et al.*, 2014). Contudo, são escassos trabalhos na literatura pautando os *Alphavirus* no que diz respeito ao dano oxidativo. Além disso, apesar dos levantamentos clínicos e epidemiológicos mostrarem associação entre *Alphavirus* e poliartrites persistentes, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais isso acontece. Assim, os resultados obtidos nesse trabalho, relacionando o efeito da infecção pelo MAYV no perfil oxidativo, inflamatório e na modulação das defesas antioxidantes poderia ser útil para ampliar o conhecimento sobre as características patogênicas deste vírus.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que, em macrófagos J774, o dano oxidativo associado à infecção pelo MAYV resulta de um desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes celulares. Ainda, que esse desbalanço no *status* oxidante/antioxidante é capaz de causar estresse oxidativo. Associado a esse evento, um aumento de TNF- $\alpha$  e MMP-3 após infecção pelo MAYV poderia contribuir também para os danos celulares. Em conjunto, esses achados apontam para novas abordagens para compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da infecção do MAYV, bem como outros patógenos do gênero *Alphavirus* e família *Togaviridae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S., *et al.* Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 5, p. 391-399, 2009.

AITKEN, T. H. G., *et al.* Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. **Science**, v. 131, n. 3405, p. 986-986, 1960.

AKAIKE, T., *et al.* Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 6, p. 2448-2453, 1996.

AL MEHDI, A.B., *et al.* A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substance during lung ischemia-reperfusion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1167, n. 1, p. 56-62, 1993.

AMES, B. N., *et al.* Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.

ANDERSON, C. R., *et al.* Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **Am J Trop Med**, v. 6, n. 6, p. 1012-1016, 1957.

ANDRICOPULO, A. D., *et al.* Specific inhibitors of Plasmodium falciparum thioredoxin reductase as potential antimalarial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 8, p. 2283-2292, 2006.

ARMOGIDA, M., *et al.* Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 4, p. 1211-1224, 2012.

ASSUNÇÃO-MIRANDA, I., *et al.* Pro-inflammatory response resulting from sindbis virus infection of human macrophages: Implications for the pathogenesis of viral arthritis. **Journal of medical virology**, v. 82, n. 1, p. 164-174, 2010.

ASSUNÇÃO-MIRANDA., *et al.* Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

AZEVEDO, R. S., *et al.* Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830, 2009.

BARBER, D. A.; HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. **American pharmacy**, n. 9, p. 26-35, 1994.

BARREIROS, A. L. B. S., *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BATISTA, P. M., *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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684-690, 2013.

BEATY, B. J., *et al.* Virus variation and evolution: mechanisms and epidemiological significance. **The arboviruses: epidemiology and ecology**, v. 1, p. 59-85, 1988.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 19633-19636, 1997.

BECKMAN, J.S., *et al.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases\*. **Journal of periodontology**, v. 64, n. 5s, p. 474-484, 1993.

BOUQUILLARD, E.; COMBE, B. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. **Joint Bone Spine**, v. 76, n. 6, p. 654-657, 2009.

BRONZONI, R.V.M., *et al.* Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 8, p. 456-461, 2004.

BROWN, L. A. Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 266, n. 2, p. L172-L177, 1994.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.

CALISHER, C.H., *et al.* Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 8, n. 3, p. 243, 1974.

CALVET, G., *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, 2016.

CAMINI, F. C., *et al.* Caraparu virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection. **Archives of Virology**, v. 159, n. 10, p. 2621-2632, 2014.

CASOLA, A., *et al.* Oxidant tone regulates RANTES gene expression in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus Role in viral-induced interferon regulatory factor activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19715-19722, 2001.

CASTRO, S. M., *et al.* Antioxidant treatment ameliorates respiratory syncytial virus-induced disease and lung inflammation. **American journal of respiratory and critical care medicine**,

v. 174, n. 12, p. 1361-1369, 2006.

CHEN, W., *et al.* Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 35–43, 2015.

CHOW, A., *et al.* Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of infectious diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

CLAUS, C., *et al.* Activity increase in respiratory chain complexes by rubella virus with marginal induction of oxidative stress. **Journal of virology**, v. 87, n. 15, p. 8481–92, 2013.

COACCIOLI, S., *et al.* Oxidant/antioxidant status in patients with chronic HIV infection. **La Clinica Terapeutica**, v. 161, n. 1, p. 55-58, 2010.

COFFEY, L. L., *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.

COIMBRA, T. L., *et al.* Mayaro virus: imported cases of human infection in Sao Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, n. 4, p. 221–224, 2007.

CUTLER, R.G. Antioxidants, aging and longevity. **Free radicals in biology**, v. 6, p. 371-428, 1984.

DARVESH, A.; BISHAYEE, A. Selenium in the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 10, n. 4, p. 338-345, 2010.

DE FIGUEIREDO, R.M.P., *et al.* Exanthematous diseases and the first epidemic of dengue to occur in Manaus, Amazonas State, Brazil, during 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 476-479, 2004.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 257, n. 4, p. L163-L173, 1989.

DE THOISY, B., *et al.* Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326, 2003.

DHANWANI, R., *et al.* Differential proteome analysis of Chikungunya virus-infected newborn mice tissues reveal implication of stress, inflammatory and apoptotic pathways in disease pathogenesis. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1936-1951, 2011.

DHANWANI, R., *et al.* Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus Research**, v. 163, n. 2, p. 563–572, 2012.

DIAZ, M.O., *et al.* Homozygous deletion of the alpha-and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n.

14, p. 5259-5263, 1988.

DROGE, W., *et al.* Oxidant-antioxidant status in human immunodeficiency virus infection. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 594-601. 1994.

DULBECCO, R., *et al.* One-step growth curve of Western equine encephalomyelitis virus on chicken embryo cells grown in vitro and analysis of virus yields from single cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 99, n. 2, p. 183, 1953.

DUSTING, Gregory J.; MACDONALD, Peter S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Annals of medicine**, v. 27, n. 3, p. 395-406, 1995.

DUYGU, F., *et al.* Relationship of oxidative stress in hepatitis B infection activity with HBV DNA and fibrosis. **Annals of laboratory medicine**, v. 32, n. 2, p. 113-118, 2012.

EVANS M.D., *et al.* Aqueous cigarette tar extracts damage human alpha-1-proteinase inhibitor. **Chemico-biological interactions**, v. 79, n. 2, p. 151-164, 1991.

FANG, Y., *et al.* Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FASSBINDER-ORTH, C. A., *et al.* Buggy Creek Virus (Togaviridae: Alphavirus) Upregulates Expression of Pattern Recognition Receptors and Interferons in House Sparrows (*Passer domesticus*). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 6, p. 439-446, 2014.

FERNANDEZ-CHECA, J.C., *et al.* GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 273, n. 1, p. G7-G17, 1997.

FIGUEIREDO, L.T.M., *et al.* Study of two different enzyme immunoassays for the detection of Mayaro virus antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 3, p. 303-307, 1989.

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 224-229. 2007.

FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L.T.M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677-683, 2014.

FIGUEIREDO, L.T.M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 233-234, 2015.

FORRESTER, N. L., *et al.* Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2729-2738, 2012.

FORMAN, H. J.; DICKINSON, D. A. Introduction to serial reviews on 4-hydroxy-2-nonenal as a signaling molecule. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 5, p. 594-596, 2004.

FORMAN, H. J. Use and abuse of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in studies of signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 7, p. 926-932, 2007.

FORSHEY, B. M., *et al.* Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e787, 2010.

GARDNER, J., *et al.* Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. **Journal of Virology**, v. 84, n. 16, p. 8021–8032, 2010.

GARCIA-RUIZ, C; FERNANDEZ-CHECA, J.C. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival–death switch. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 21, n. s3, p. S3-S6, 2006.

GARGOURI, B., *et al.* Induction of Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle in vitro causes oxidative stress in lymphoblastoid B cell lines. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 324, n. 1-2, p. 55-63, 2009.

GIL, L., *et al.* Evaluation of redox status and immunological indicators in HTLV-I seropositive subjects. **Bioquimia**, v. 27, p. 26-31, 2002.

GIL, L., *et al.* Oxidative stress in adult dengue patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 5, p. 652-657, 2004.

GLORIEUX, C., *et al.* Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 84-97, 2015.

GOULD, E. A., *et al.* Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 111–124, 2010.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUERRA, A. N., *et al.* Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. **Purinergic signalling**, v. 3, n. 1-2, p. 39-51, 2007.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**, v. 16, n. 1, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental health perspectives**, v. 102, n. Suppl 10, p. 5, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. **Free radicals in biology and medicine**, v. 86, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: an overview. 1990.

HALLIWELL, B.; HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine, 4th edn. **Clarendon**. 2007.

HALSEY, E. S., *et al.* Mayaro virus infection, Amazon basin region, Peru, 2010–2013. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 11, p. 1839, 2013.

HASSING, R., *et al.* Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. **Journal of Infection**, v. 61, n. 4, p. 343-345, 2010.

HERAUD J.M., *et al.* First case of yellow fever in French Guiana since 1902. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 3, p. 429, 1999.

HERRERO, L. J., *et al.* Critical role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Ross River virus-induced arthritis and myositis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 29, p. 12048-12053, 2011.

HEFFNER, J. E.; REPINE, J.E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **American Review of Respiratory Disease**, v. 140, n. 2, p. 531-554, 1989.

HEUKELBACH, J., *et al.* Zika virus outbreak in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 02, p. 116-120, 2016.

HOARAU, J. J. *et al.* Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010.

HOSAKOTE, Y. M., *et al.* Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 41, n. 3, p. 348-357, 2009.

HOSAKOTE, Y. M., *et al.* Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 183, n. 11, p. 1550-1560, 2011.

HOSAKOTE, Y. M., *et al.* Antioxidant mimetics modulate oxidative stress and cellular signaling in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 303, n. 11, p. L991–1000, 2012.

HUANG, Sheng-Hai., *et al.* Inhibitory effect of melatonin on lung oxidative stress induced by respiratory syncytial virus infection in mice. **Journal of pineal research**, v. 48, n. 2, p. 109-116, 2010.

HWANG, C. J. S. A., *et al.* Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. **Science**, v. 257, n. 5076, p. 1496-1502, 1992.

IGNARRO, L. J. **Rev. Farm. Bioquim.** Univ. S. Paulo. 34 (C04), 3. 1998.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV**. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/>. Acesso dia: 20/10/2015.

IVANOV, A. *et al.* HCV core protein uses multiple mechanisms to induce oxidative stress in Human Hepatoma Huh7 cells. **Viruses**, v. 7, n. 6, p. 2745–2770, 2015.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

JORDÃO J., *et al.* Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 31, n. 3, p. 434-49, 1998.

JOSEPH P.D., *et al.* Molecular Toxicology, 1st ed., Oxford University Press: New York, p.152-186, 1997.

JOUBERT, P., *et al.* Chikungunya virus–induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 5, p. 1029-1047, 2012.

KANZOK, S. M., *et al.* J. Mol. Biol. 2000, 275, 40180; RAHLFS, S.; SCHIRMER, R. H.; BECKER, K.; Cell. Mol. Life Sci. 2002, 59, 1024; RAHLFS, S. *et al.* Biol. Chem. 2003, 348, 551.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviroses and certain other viroses of vertebrates. San Antonio, USA. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1147p, 1985.

KEOGH, B., *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinases ameliorates blood–brain barrier disruption and neuropathological lesions caused by avirulent Semliki Forest virus infection. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 94, n. 3, p. 185-190, 2003.

KIELIAN, M., *et al.* Specific roles for lipids in virus fusion and exit. Examples from the alphaviruses. **Sub-cellular biochemistry**, v. 34, p. 409-455, 2000.

KINNULA, V.L., **et al.** Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. Laboratory investigation; **a journal of technical methods and pathology**, v. 73, n. 1, p. 3, 1995.

KLASSEN, P., *et al.* Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. **Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 542-547, 2004.

KOVACIC, P; JACINTHO, J. D. Mechanisms of carcinogenesis focus on oxidative stress and electron transfer. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 7, p. 773-796, 2001.

KUHN, R. J. Togaviridae: The Viruses and Their Replication. In: D. M. Knipe e P. M. Howley (Ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Togaviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, v. 2, p. 1002-1022, 2007.

KUNO, G; CHANG, G. J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 608-637, 2005.

LIDBURY, B. A., *et al.* Macrophage-derived proinflammatory factors contribute to the development of arthritis and myositis after infection with an arthrogenic alphavirus. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 11, p. 1585–1593, 2008.

LIN, K., *et al.* Decreased intracellular superoxide levels activate Sindbis virus-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13650-13655, 1999.

LIU, B. ROS and p53: a versatile partnership. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1529-1535, 2008.

LIU, T., *et al.* Reactive Oxygen Species Mediate Virus-induced STAT Activation ROLE OF TYROSINE PHOSPHATASES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 2461-2469, 2004.

LONG, K. C., *et al.* Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 750–757, 2011.

LOPES, N., *et al.* Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.

MACHIDA, K., *et al.* Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. **Journal of virology**, v. 80, n. 14, p. 7199-7207, 2006.

MANDELL, G., *et al.* Enfermedades infecciosas principios y prácticas. Volumen 2. 5ta edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; p. 3500, 2002.

MARKLUND, S., *et al.* Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MASTERS, C., *et al.* On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 113-120, 1986.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 711-760, 1983.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria Nº104, de 25 de Janeiro de 2011. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso dia 20/10/2015.

MONATH, T.P. Yellow Fever. In: *The Arboviruses: ecology and epidemiology*. v. 5. **CRC Press, Boca Raton, USA**. p. 139-241, 1988.

MONCADA, S. R. M. J., *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOTA, M. T. O., *et al.* Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109-1122, 2015.

MOURÃO, M. P. G., *et al.* Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.

MUÑOZ, M.; NAVARRO, J.C. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, v. 32, n. 2, p. 288-302, 2012.

MURPHY, G.; DOCHERTY, A.J.P. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 7, n. 2, p. 120-125, 1992.

NAGEM, R. A. P., *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human catalase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 55, n. 9, p. 1614-1615, 1999.

NAKASHIMA, I., *et al.* 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. **Molecular aspects of medicine**, v. 24, n. 4, p. 231-238, 2003.

NAKATSUE, T., *et al.* Acute infection of Sindbis virus induces phosphorylation and intracellular translocation of small heat shock protein HSP27 and activation of p38 MAP kinase signaling pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 253, n. 1, p. 59-64, 1998.

NAKAYA, H. I., *et al.* Gene profiling of chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 11, p. 3553–3563, 2012.

NAPOLEÃO-PEGO, P., *et al.* Mayaro Virus Disease. **J Hum Virol Retrovirol**, v. 1, n. 3, p. 00018, 2014.

NARAYANAN, A., *et al.* Alteration in superoxide dismutase 1 causes oxidative stress and p38 MAPK activation following RVFV infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20354, 2011.

NAVARRETE-ESPINOSA, J.; GÓMEZ-DANTÉS, H. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**, v. 44, n. 4, p. 347-353, 2006.

NEEL, J.V., *et al.* Further studies of the Xavante Indians. IX. Immunologic status with respect to various diseases and organisms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, n. 3, p. 486-98, 1968.

NEUMAYR, A., *et al.* Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, northern Peru. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 4, p. 695-696, 2012.

NG, L. F., *et al.* IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. **PloS one**, v. 4, n. 1, p. e4261, 2009.

OLAGNIER, D., *et al.* Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 12, p. e1004566, 2014.

OPAS: **Organização Pan-Americana da Saúde**, acesso em 02/12/2015.

PAL, S., *et al.* Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 25, n. 3, p. 627-634, 2010.

PARGE, H. E., *et al.* Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu, Zn superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 13, p. 6109-6113, 1992.

PASTOR, N., *et al.* A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. **Journal of molecular biology**, v. 304, n. 1, p. 55-68, 2000.

PATWARI, P., *et al.* The interaction of thioredoxin with Txnip evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 31, p. 21884-21891, 2006.

PAUVOLID-CORREA, A., *et al.* Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 125-133, 2015.

PERRY, J. J. P., *et al.* The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 245-262, 2010.

PETERHANS, E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 5, p. 962S-965S, 1997a.

PETERHANS, E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. **Biological trace element research**, v. 56, n. 1, p. 107-116, 1997b.

PFEFFER, M., *et al.* Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 6, p. 709-718, 1997.

PIALOUX, G., *et al.* Chikungunya, an epidemic arbovirose. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 319-327, 2007.

PINHEIRO, F.P., *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **Am. J. Trop. Med.**, v. 3, n. 30, p. 674-681, 1981.

PINHEIRO, F.P., *et al.* Arboviroses: Aspectos clínico-epidemiológicos. In: Instituto Evandro Chagas, 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Belém: **Fundação Serviços de Saúde Pública**, v. 1, p.375-408, 1986.

PORTER, N. A., *et al.* Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, n. 4, p. 277-290, 1995.

POWERS, A. M., *et al.* Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 3, p. 461-469, 2006.

QIN, Y.; TIAN, Y.P. Protective effects of total glucosides of paeony and the underlying mechanisms in carbon tetrachloride-induced experimental liver injury. **Archives of medical science : AMS**, v. 7, n. 4, p. 604-12, 2011.

RAHMAN, I., *et al.* Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European journal of pharmacology**, v. 533, n. 1, p. 222-239, 2006.

RATNAM, D. V., *et al.* Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

RECEVEUR, M. C., *et al.* Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010. **Euro Surveill**, v. 15, n. 18, p. 19563, 2010.

RESHI, M. L., *et al.* RNA viruses: ROS-mediated cell death. **International journal of cell biology**, v. 2014, 2014.

RIDNOUR, L.A., *et al.* Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 37, p. 13147-13152, 2005.

RIVA, D. A., *et al.* Oxidative stress in Vero cells infected with *vesicular stomatitis virus*. **Intervirolgy**, v. 49, n. 5, p. 294-298, 2006.

ROE, K., *et al.* West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. **Journal of General Virology**, v. 93, n. Pt\_6, p. 1193-1203, 2012.

ROTRUCK, J.T., *et al.* Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, p. 588-590, 1972.

RULLI, N. E., *et al.* The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections.

**Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1102, n. 1, p. 96-108, 2007.

SANTIAGO, F. W., *et al.* Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004104, 2015.

SCHAEFFER, M., *et al.* Epidemic Jungle Fevers Among Okinawan Colonists in the Bolivian Rain Forest I. Epidemiology. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 8, n. 3, p. 372-396, 1959.

SCHMALJOHN, A. L., *et al.* Alphaviruses (togaviridae) and flaviviruses (flaviviridae). **Medical Microbiology**, v. 54, 1996.

SCHULZE-OSTHOFF, K., *et al.* Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 8, p. 5317-5323, 1992.

SCHWARZ, K. B. Oxidative stress during viral infection: a review. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 5, p. 641-649, 1996.

SEET, R.C., *et al.* Oxidative damage in dengue fever. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 375-380, 2009.

SEN, S., *et al.* Maintenance of higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, and its mechanism of action to induce growth in breast cancer cells: important roles of bioactive catalase and PP2A. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 8, p. 1541-1551, 2012.

SERRA, O. P., *et al.* Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. AHEAD, p. 0-0, 2016.

SHOPE, R. E. Medical significance of togaviruses: an overview of diseases caused by togaviruses in man and in domestic and wild vertebrate animals. **The togaviruses**, p. 47-82, 1980.

SIES, H.; MOSS, K. M. A Role of Mitochondrial Glutathione Peroxidase in Modulating Mitochondrial Oxidations in Liver. **European Journal of Biochemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-383, 1978.

SIES, H. Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. **Oxidative stress**, p. 73-90, 1985.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9, p. 916-921, 1999.

SILVA, M. Participação e homeostase do ferro no diabetes tipo 1 em modelos animais. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Biologia da Universidade Federal de Ouro Preto, 2011.

SIMIC, M. G., *et al.* Oxygen Radicals in Biology and Medicine. **Basic Life Sciences**, v. 49, 1988.

SLEKAR, K.H., *et al.* The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 28831-28836, 1996.

SLOT, J. W., *et al.* Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 55, n. 3, p. 363-371, 1986.

SOUSA, I. P. *et al.* Envelope lipid-packing as a critical factor for the biological activity and stability of alphavirus particles isolated from mammalian and mosquito cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 3, p. 1730-6, 2011.

STATES, U.; NILE, W.; STATES, U. Emerging and Re-Emerging. **National Institute of Allergy and Infectious Diseases**, n. May, p. 71-82, 2001.

STEBBENS, W.E. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. **Experimental and molecular pathology**, v. 77, n. 2, p. 121-132, 2004.

STOWE, D.F.; CAMARA, A.K.S. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 6, p. 1373-1414, 2009.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 491, 1994.

SUHRBIER, A; MAHALINGAM, S. The immunobiology of viral arthritides. **Pharmacology & therapeutics**, v. 124, n. 3, p. 301-308, 2009.

SUHRBIER, A., *et al.* Arthritogenic alphaviruses - an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420-429, 2012.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. **Current opinion in rheumatology**, v. 19, n. 3, p. 289-295, 2007.

TAYLOR, S. F., *et al.* Recurrent arthralgias in a patient with previous Mayaro fever infection. **Southern medical journal**, v. 98, n. 4, p. 484-486, 2005.

TERZIAN, A. C. B., *et al.* Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 3, p. 291-300, 2011.

TESH, R.B., *et al.* Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical infectious diseases**, v. 28, n. 1, p. 67-73, 1999.

THEILACKER, C., *et al.* Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. September 2011, p. 369, 2013.

TIAN, Y., *et al.* Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 397, n. 3, p. 420-424, 2010.

TOIVANEN, A., *et al.* Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? **Current opinion in rheumatology**, v. 20, n. 4, p. 486-490, 2008.

TORRES, J.R., *et al.* Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. *Emerg Infect Dis*, v. 10, n. 7, p. 1304-1306, 2004.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., *et al.* Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico. Leão, R. N. Q. (ed). Belém: editora CEJUP Press, p. 208- 225. 1997.

TSANG, C. K., *et al.* Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nature communications**, v. 5, 2014.

VACA, C. E., *et al.* Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 195, n. 2, p. 137-149, 1988.

VALKO, M; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005.

VALKO, M., *et al.* Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1527, n. 3, p. 161-166, 2001.

VALKO, M., *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VALKO, M., *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, P. F. C., *et al.* Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Instituto Evandro Chagas, p. 72-99, 1998.

VASCONCELOS, H. B., *et al.* Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 129-133, 2009.

VASILAKIS, N; TESH, R. B. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. **Current opinion in virology**, v. 15, p. 69-74, 2015.

VIEIRA, C. J. D. S. P., *et al.* Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, v. 147, p. 12–16, 2015.

WANG T. & WEINMAN S.A. Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C. **J Gastroenterol Hepatol** . v.21, p.34-37, 2006.

WANG, J., *et al.* Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55407, 2013.

WAHLBERG, J. M., *et al.* The heterodimeric association between the membrane proteins of Semliki Forest virus changes its sensitivity to low pH during virus maturation. **Journal of virology**, v. 63, n. 12, p. 4991-4997, 1989.

WAY, S.J.R., *et al.* Persistent Ross River virus infection of murine macrophages: an in vitro model for the study of viral relapse and immune modulation during long-term infection. **Virology**, v. 301, n. 2, p. 281-292, 2002.

WEAVER, S. C., *et al.* Venezuelan equine encephalitis. **Annual Reviews in Entomology**, v. 49, n. 1, p. 141-174, 2004.

WEAVER, S.C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: Mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360–363, 2013.

WILLIAMS, V.M., *et al.* Human papillomavirus type 16 E6\* induces oxidative stress and DNA damage. **Journal of virology**, v. 88, n. 12, p. 6751-6761, 2014.

WU D. & YOTNDA P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers.,**J.Visualized**. p57. 3357, 2011.

XIONG, Q. *et al.* Acute effects of microcystins exposure on the transcription of antioxidant enzyme genes in three organs (liver, kidney, and testis) of male Wistar rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 361–367, 2010.

YAHYA, R. S., *et al.* Role of interleukin-8 and oxidative stress in patients with hepatocellular carcinoma. **Clin Lab**, v. 59, n. 9-10, p. 969-976, 2013.

YOSHINAKA, Y., *et al.* Induction of manganese-superoxide dismutase in MRC-5 cells persistently infected with an alphavirus, sindbis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 261, n. 1, p. 139-143, 1999.

ZACKS, M. A.; PAESSLER, S. Encephalitic alphaviruses. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3, p. 281-286, 2010.

ZHOU, J., *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor during viral encephalitis. **Journal of virology**, v. 79, n. 8, p. 4764-4773, 2005.

ZUCHI, N., *et al.* Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820-823, 2014.

ZUO, L., *et al.* Molecular mechanisms of reactive oxygen species-related pulmonary inflammation and asthma. **Molecular immunology**, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2013.

## ANEXOS

## 1) Trabalhos apresentados em congressos



**XXVI** Brazilian Congress  
of Virology  
X Mercosur Meeting of Virology  
11 to 14 October 2015  
Florianópolis, SC  
Costão do Santinho Resort

*Certificate*

We hereby certify that the abstract entitled  
INFECTION BY MAYARO VIRUS (TOGAVIRIDAE) IN HEPG2 CELLS INCREASE REACTIVE OXYGEN SPECIES, OXIDATIVE  
STRESS BIOMARKER AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY

authored by  
Camini, F.C.; Caetano, C.C.S; Almeida, L.T.; Castro, C.P.M.; Magalhães, J.C.; Magalhães, C.L.B.

was presented at the XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology,  
from October 11 - 14, 2015, in Florianópolis - SC, Brazil, at the Resort Costão do Santinho.

Organization

*Célia Regina Monte Barardi*  
Dra. Célia Regina Monte Barardi  
President of XXVI CBV

*Bergmann Morais Ribeiro*  
Dr. Bergmann Morais Ribeiro  
President of Brazilian Society of Virology

**XXVI** Brazilian Congress  
of Virology  
X Mercosur Meeting of Virology  
11 to 14 October 2015  
Florianópolis, SC  
Costão do Santinho Resort

*Certificate*

We hereby certify that the abstract entitled  
EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT DEFENCE IN HEPG2 CELLS INFECTED WITH THE CARAPARU  
VIRUS (BUNYAVIRIDAE)

authored by  
Almeida, L.T.; Camini, F.C.; Caetano, C.C.S.; Magalhães, J.C.

was presented at the XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology,  
from October 11 - 14, 2015, in Florianópolis - SC, Brazil, at the Resort Costão do Santinho.

Organization

*Célia Regina Monte Barardi*  
Dra. Célia Regina Monte Barardi  
President of XXVI CBV

*Bergmann Morais Ribeiro*  
Dr. Bergmann Morais Ribeiro  
President of Brazilian Society of Virology