

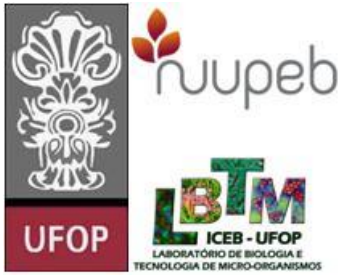


UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRO-ORGANISMOS

**Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes  
após infecção pelo *Mayaro virus* e prospecção da atividade  
antiviral e antioxidante da silimarina**

**FERNANDA CAETANO CAMINI**

**OURO PRETO  
2018**



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  
após infecção pelo *Mayaro virus* e prospecção da atividade  
antiviral e antioxidante da silimarina**

**FERNANDA CAETANO CAMINI**

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

**OURO PRETO  
2018**

C146a Camini, Fernanda Caetano.  
Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes após infecção pelo Mayaro virus e prospecção da atividade antiviral e antioxidante da silimarina [manuscrito] / Fernanda Caetano Camini. - 2018.  
104f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cintia Lopes de Brito Magalhães.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Area de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Arbovirus. 2. Estresse oxidativo. I. Magalhães, Cintia Lopes de Brito. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 578.833.1

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



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**



**ATA DE DEFESA DE TESE**

Aos 15 dias do mês de março do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda Fernanda Caetano Camini, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Cintia Lopes de Brito Magalhaes (Presidente - UFOP), pela Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Membro - UFOP), pela Profa. Danielle da Glória de Souza (Membro - Externo), pela Profa. Giliane de Souza Trindade (Membro - Externo), pela Profa. Maria Lucia Pedrosa (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda Fernanda Caetano Camini 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação do Estresse Oxidativo e Defesas Antioxidantes Após Infecção Pelo Mayaro Virus (Togaviridae)", na área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 15 de março de 2018.

Presidente: Cintia Lopes de Brito Magalhaes

Membro: Giliane de Souza Trindade

Membro: Danielle da Glória de Souza

Membro: Maria Lucia Pedrosa

Membro: Daniela Caldeira Costa

Doutorando: Fernanda Caetano Camini

*Aos meus pais, João Batista e Maria Marta, por todo amor e apoio incondicionais!*

À minha orientadora, **Cintia Lopes de Brito Magalhães**, pela excelência em seu trabalho. Uma verdadeira orientadora, tanto de projetos quanto de pessoas.

Obrigada pela oportunidade e pela confiança.

A Deus e a Nossa Senhora, por sempre iluminar meu caminho e minha vida. Agradeço mais uma vez por esta e todas as minhas conquistas.

A todos meus familiares, especialmente meus irmãos e meus avós (*in memoriam*), que sempre me ajudaram incondicionalmente.

Ao Adriano, pelo amor e companheirismo. Por ter contribuído para que essa jornada se tornasse mais leve.

À Camila e Letícia, por toda ajuda neste trabalho e em todos os momentos, dentro e fora do laboratório.

A todos do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos pela boa convivência e troca de conhecimentos: José, Cyntia, Paola, Erica, Ana Cláudia, Célia, Carini, Rafaela, Tales e aos professores Silvana, Breno e Maria Célia.

Agradeço também aos outros laboratórios do NUPEB, e em especial ao LBM e Lafex, que foram de grande importância para a realização deste trabalho.

Aos amigos que Ouro Preto me deu e seguiram comigo nessa caminhada, Camila Ramos, Laís Roquete, Tati e àqueles que sempre estiveram comigo, mesmo de longe, Gabi e Andréa.

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

## RESUMO

O *Mayaro virus* (MAYV) é um arbovírus negligenciado, de caráter emergente, que causa em humanos uma síndrome febril, a febre Mayaro, muitas vezes acompanhada por um quadro de artrite/artralgia incapacitante. Apesar de a febre Mayaro ser conhecida por décadas, não existe terapia ou vacina disponível e, ainda, os mecanismos celulares que contribuem para a patogênese do MAYV são pouco elucidados. Nesse contexto, um grande número de trabalhos tem demonstrado que o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese de uma variedade de agentes virais. O estresse oxidativo é causado pelo aumento de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e/ou uma redução no sistema de defesa antioxidante. Dentre os principais antioxidantes celulares destacam-se as enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) e, dentre os não enzimáticos, a Glutathione. Assim, uma vez que pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais o MAYV induz danos celulares e que o estresse oxidativo pode ser fator chave na patogênese de infecções virais, este trabalho teve como objetivo investigar se a infecção pelo MAYV seria capaz de induzir estresse oxidativo e/ou alterar as defesas antioxidantes. Células hepáticas humanas, HepG2, foram infectadas e em diferentes horas pós-infecção foram avaliados parâmetros oxidantes e antioxidantes. A infecção pelo MAYV levou a um aumento na produção de ERO e dos biomarcadores de estresse, malondialdeído e proteína carbonilada, bem como uma diminuição da razão glutathione reduzida/oxidada (GSH/GSSG). De maneira geral, a infecção causou um aumento nas defesas antioxidantes. Observamos um aumento nas atividades de SOD e CAT, bem como um aumento no conteúdo celular de Glutathione. Como o ambiente redox celular é influenciado pela produção e remoção de ERO, nós hipotetizamos que, apesar do aumento nas defesas antioxidantes, uma superprodução de ERO foi responsável pelo estresse oxidativo causado pela infecção pelo MAYV. Em seguida, nós prospectamos se a silimarina, composto originado da planta *Silybum marianum*, poderia apresentar atividade anti-MAYV, bem como inibir os danos oxidativos gerados pela infecção. Nossos resultados mostraram que a silimarina possui efetiva atividade antiviral *in vitro* contra o MAYV, bem como protege as células do dano oxidativo associado à infecção pelo vírus. Uma vez que a doença causada pelo MAYV é um problema de saúde pública e de caráter emergente, ampliar os conhecimentos sobre os aspectos relacionados à infecção por esse vírus é de primordial importância. Coletivamente, os resultados aqui obtidos elucidam alguns mecanismos que contribuem para os danos celulares causados pela infecção pelo MAYV.



**ABSTRACT**

*Mayaro virus* (MAYV) is an arbovirus neglected, emergent that causes in humans a febrile syndrome, Mayaro fever, often accompanied by disabling arthritis/arthralgia. Although Mayaro fever has been known for decades, there is no therapy or vaccine available, and yet the cellular mechanisms that contribute to the pathogenesis of MAYV are poorly elucidated. In this context, a large number of studies have demonstrated that oxidative stress may contribute to the pathogenesis of a variety of viral agents. Oxidative stress is caused by increased Reactive Oxygen Species (ROS) and/or a reduction in the antioxidant defense system. Among the main cellular antioxidants are the enzymes Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) and, among the non-enzymes, Glutathione. Thus, since little is known about the mechanisms by which MAYV induces cellular damage and that oxidative stress may be a key factor in the pathogenesis of viral infections, this work aimed to investigate if the infection by the MAYV would be able to induce oxidative stress and/or change antioxidant defenses. Human hepatic cells, HepG2, were infected and at different post-infection hours oxidative and antioxidant parameters were evaluated. MAYV infection led to an increase in ROS production and stress biomarkers, malondialdehyde and carbonyl protein, as well as a decrease in the reduced/oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG). In general, the infection caused an increase in antioxidant defenses. We observed an increase in the activities of SOD and CAT, as well as an increase in the cellular content of Glutathione. As the cellular redox environment is influenced by the production and removal of ROS, we hypothesized that, despite the increase in antioxidant defenses, an overproduction of ROS was responsible for the oxidative stress caused by the MAYV infection. Next, we investigated whether silymarin, a compound from the *Silybum marianum* plant, could present anti-MAYV activity, as well as inhibit the oxidative damage generated by the infection. Our results showed that silymarin possesses effective antiviral activity *in vitro* against MAYV, as well as protects cells from the oxidative damage associated with virus infection. Since the disease caused by the MAYV is a public health problem of an emerging nature, increasing knowledge about the aspects related to the virus infection is of primordial importance. Collectively, the results obtained here elucidate some mechanisms that contribute to the cellular damage caused by the MAYV infection.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- BHK-21** – Células de rim de hamster bebê
- BSA** – Albumina Sérica Bovina
- CAT** – Catalase
- CC<sub>50</sub>** – Concentração do composto que reduz 50% da viabilidade celular
- CE<sub>50</sub>** - Concentração efetiva/protetiva para 50% das células infectadas
- CEV** – Vírus da Encefalite da Califórnia
- CHIKV** – Vírus Chikungunya
- CMC** – Carboximetilcelulose
- DENV** – Vírus da Dengue
- DMEM** – Meio Dulbecco's Modified Eagle
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DP** – Desvio Padrão
- ECP** – Efeito Citopático
- EEEV** – Vírus da Encefalite Equina Oriental
- ERO** – Espécie Reativa de Oxigênio
- GAPDH** – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GPx** – Glutaciona Peroxidase
- GR** – Glutaciona Redutase
- GSSG** – Glutaciona Oxidada
- GSH** – Glutaciona reduzida
- GST** – Glutaciona S-transferase
- HBV** – Vírus da Hepatite B
- HCV** – Vírus da Hepatite C
- HepG2** – Células de carcinoma hepático humano
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- Hpi** – Horas pós-infecção
- HPV** – Vírus do papiloma humano
- HTLV-1** – Vírus Linfotrópico Humano de Células T
- IS** – Índice de Seletividade
- JEV** – Vírus da Encefalite Japonesa

- LACV** – Vírus La Crosse
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade
- MAYV** – Vírus Mayaro
- MDA** – Malondialdeído
- MEF** – Células de fibroblastos embrionários murinos
- MOI** – Multiplicidade de Infecção
- MTT** – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio)
- 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
- ROCV** – Vírus Rocio
- RRV** – Vírus Ross River
- RSV** – Vírus Respiratório Sincicial
- RVFV** – Vírus da Febre do Vale do Rift
- SESV** – Vírus *Southern Elephant Seal*
- SFB** – Soro Fetal Bovino
- SINV** – Vírus Sindbis
- SLEV** – Vírus da Encefalite de St. Louis
- SLV** – Vírus *Semliki Forest*
- SOD** – Superóxido Dismutase
- SPDV** – Vírus *Salmon Pancreas Disease*
- TBARS** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
- TBHP** – Hidroperóxido *tert*-butil
- TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral Alfa
- UFP** – Unidade Formadora de Placa
- VEEV** – Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
- VERO** – Células de rim de macaco verde africano

**VSV** – Vírus da Estomatite Vesicular

**WEEV** – Vírus da Encefalite Equina Ocidental

**WHO** – Organização Mundial de Saúde

**WNV**–Vírus West Nile

**YFV** – Vírus da Febre Amarela

**ZIKV** – Vírus Zika

**LISTA DE TABELAS**

Tabela I – Principais alfaviroses no mundo.....	12
Tabela II – Algumas espécies reativas e suas meias-vidas .....	21
Tabela III – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores .....	41
Tabela IV: Concentração citotóxica da silimarina em Vero e HepG2.....	56
Tabela V: CE <sub>50</sub> e IS da silimarina em Vero e HepG2.....	60

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico dos arbovírus .....	6
<b>Figura 2.</b> Distribuição global de algumas arboviroses importantes.....	7
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do genoma do MAYV .....	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura dos <i>Alphavirus</i> .....	10
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do ciclo replicativo do CHIKV .....	14
<b>Figura 6.</b> Distribuição do MAYV nas Américas .....	15
<b>Figura 7.</b> Ciclo de transmissão do MAYV .....	16
<b>Figura 8.</b> Envolvimento de articulações na infecção pelo MAYV .....	18
<b>Figura 9.</b> A célula como fonte de ERO.....	22
<b>Figura 10.</b> Formação de ERO e mecanismos antioxidantes .....	28
<b>Figura 11.</b> Estrutura básica de um flavonoide .....	32
<b>Figura 12.</b> Estrutura da planta <i>Silybum marianum</i> .....	33
<b>Figura 13.</b> Caracterização da infecção de células HepG2 pelo MAYV.....	46
<b>Figura 14.</b> MAYV induz a formação de ERO em células HepG2.....	47
<b>Figura 15.</b> MAYV induz aumento de MDA em células HepG2.....	48

<b>Figura 16.</b> MAYV induz aumento de proteína carbonilada em células HepG2.....	49
<b>Figura 17.</b> MAYV altera conteúdo de glutatona total e da razão GSH/GSSG.....	50
<b>Figura 18.</b> MAYV altera as atividades das enzimas SOD e CAT.....	51
<b>Figura 19.</b> MAYV altera expressão gênica de SOD1 e CAT .....	52
<b>Figura 20.</b> Expressão proteica de SOD1 e $\beta$ -actina .....	54
<b>Figura 21.</b> Expressão proteica de CAT e $\beta$ -actina .....	55
<b>Figura 22.</b> Atividade antiviral global da silimarina em células Vero .....	57
<b>Figura 23.</b> Atividade antiviral global da silimarina em células HepG2.....	58
<b>Figura 24.</b> Análise da redução do efeito citopático em células HepG2 .....	59
<b>Figura 25.</b> Atividade antiviral da silimarina pelo Ensaio de Redução de Placas .....	60
<b>Figura 26.</b> Efeito do tratamento com silimarina na produção de ERO.....	62
<b>Figura 27.</b> Silimarina protege células HepG2 contra o estresse oxidativo.....	63
<b>Figura 28.</b> Representação esquemática do estresse oxidativo causado pelo MAYV .....	72

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	viii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xi
<b>Lista de Figuras</b> .....	xii
<b>1.Introdução</b> .....	1
<b>2.Revisão Bibliográfica</b> .....	4
2.1. Arbovírus .....	4
2.2. Família <i>Togaviridae</i> , gênero <i>Alphavirus</i> .....	9
2.3. <i>Mayaro virus</i> (MAYV) .....	12
2.4. ERO e Estresse Oxidativo .....	20
2.5. Defesas Antioxidantes .....	24
2.6. Estresse Oxidativo e Doenças Virais .....	28
2.7. Flavonoides – Silimarina .....	32
<b>3. Objetivos</b> .....	35
3.1. Objetivo Geral .....	35
3.2. Objetivos Específicos .....	35
<b>4. Material e Métodos</b> .....	36
4.1. Células e vírus .....	36
4.2. Titulação do MAYV.....	36
4.3. Silimarina .....	37
4.4. Cinética de crescimento do MAYV e ensaio de viabilidade celular .....	37
4.5. Dosagem de ERO .....	37
4.6. Dosagem de Malondialdeído .....	38
4.7. Dosagem de Proteína carbonilada ... ..	38
4.8. Dosagem de glutathiona total e da relação GSH/GSSG .....	39
4.9. Dosagem da atividade total de SOD e CAT .....	39
4.10. Expressão do RNAm de SOD1, CAT e GAPDH .....	40
4.10.1. Extração do RNA total e síntese do cDNA (RT-PCR).....	40
4.10.2. PCR em tempo real (qRT-PCR).....	40



4.11. Análise da expressão proteica de SOD e CAT .....	41
4.11.1. Extração das proteínas totais celulares .....	41
4.11.2. Western Blot .....	41
4.12. Ensaio de citotoxicidade .....	42
4.13. Ensaio antivirais .....	43
4.13.1. Ensaio antiviral global por MTT .....	43
4.13.2. Ensaio de redução de UFP .....	44
4.14. Efeito da silimarina nos parâmetros oxidativos .....	44
4.15. Análise Estatística .....	44
<b>5. Resultados .....</b>	<b>45</b>
5.1. Caracterização da infecção de células HepG2 pelo MAYV.....	45
5.2. Avaliação do <i>status</i> oxidante em células HepG2.....	46
5.2.1. Espécies Reativas de Oxigênio .....	46
5.2.2. Malondialdeído .....	47
5.2.3. Proteína carbonilada .....	48
5.3. Avaliação do <i>status</i> antioxidante em células HepG2.....	49
5.3.1. Glutathiona total e relação GSH/GSSG .....	49
5.3.2. Atividade de SOD e CAT .....	51
5.3.3. Expressão gênica de SOD1 e CAT .....	52
5.3.4. Expressão proteica de SOD1 e CAT .....	53
5.4. Avaliação da atividade antiviral global da silimarina .....	55
5.4.1. Determinação da CC <sub>50</sub> .....	55
5.4.2. Avaliação da atividade antiviral da silimarina .....	56
5.4.3. Cálculo da CE <sub>50</sub> e do IS .....	59
5.5. Avaliação da atividade antiviral da silimarina por redução de UFP.....	60
5.6. Avaliação do <i>status</i> redox após tratamento com silimarina .....	61
5.6.1. Dosagem de ERO .....	61
5.6.2. Dosagem de MDA e proteína carbonilada .....	62
<b>6. Discussão .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Conclusão .....</b>	<b>71</b>
<b>8. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>73</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as doenças infecciosas emergentes e reemergentes, especialmente aquelas relacionadas aos vírus, aumentaram sua incidência e ampliaram sua distribuição geográfica, tornando-se cada vez mais preocupantes em relação à saúde pública. O Fórum Econômico Mundial apontou a disseminação de doenças infecciosas como o segundo maior risco global em termos de probabilidade de impacto potencial, seguida apenas pelas crises relacionadas à água (Hill-Cawthorne & Sorrella, 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% da população mundial apresenta risco de desenvolver doença a partir de um ou mais vetores. Ainda, as taxas de morbidade e mortalidade são muitas vezes desproporcionalmente altas em populações mais pobres, sendo que mais de 700.000 óbitos são causados por doenças transmitidas por vetores anualmente (Global Vector Control Response 2017–2030, 2017).

Ao longo da história da humanidade, a falta de monitoramento eficaz logo no início dos primeiros casos levou a epidemias de várias doenças graves, com altas taxas de mortalidade e morbidade, dentre elas as arboviroses. A globalização de doenças causadas por arbovírus é uma situação atual preocupante, porque além de serem muitas vezes doenças pouco conhecidas e negligenciadas, também são acompanhadas pela resistência dos vetores a inseticidas e resistência dos patógenos às drogas. Essas arboviroses são favorecidas pelo crescimento populacional e urbanização descontrolados; condições climáticas apropriadas para a disseminação do vetor e consequente transmissão viral; e o devastador comportamento do homem sobre o meio ambiente (Devaux, 2012).

No Brasil, destacam-se vários importantes arbovírus causadores de doenças em humanos como o *Dengue virus* (DENV), *Yellow Fever virus* (YFV), *Oropouche virus* (OROV), *Mayaro virus* (MAYV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Zika virus* (ZIKV). O MAYV, objeto de estudo deste trabalho, causa em humanos a febre Mayaro, doença com amplo espectro de sintomas. Não há casos de mortes ocasionados pela febre Mayaro, entretanto pode causar morbidade significativa, uma vez que as artralgias e artrites ocasionadas pelo vírus são muito acentuadas e incapacitantes, sendo necessária a hospitalização de muitos pacientes (Mourão et al., 2012; Assunção-Miranda et al., 2013).

Desde seu primeiro isolamento em Trinidad e Tobago, em 1954, o MAYV até pouco tempo atrás era tido como circunscrito apenas à América do Sul, em mamíferos silvestres ou

comunidades humanas ribeirinhas principalmente do Norte da América do Sul. No entanto, o número de casos humanos da febre Mayaro tem aumentado também em centros urbanos, portanto, a maior incidência humana desse vírus é patente (Mourão et al., 2012). No Brasil, a recente introdução do CHIKV, vírus pertencente ao complexo Semliki Forest do gênero *Alphavirus*, assim como o MAYV, alertou as autoridades sobre a necessidade de implementar medidas de vigilância contra a infecção por esse vírus e reforçou o potencial do MAYV reemergir, imitando a progressão epidemiológica do CHIKV. Assim, estudos com o MAYV são cruciais para uma melhor compreensão de sua real epidemiologia e patologia.

Diante da possibilidade de que a febre Mayaro 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 pesquisadores 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. Portanto, este trabalho busca elucidar importantes características frente à infecção pelo MAYV.

Estudos recentes mostram que o estresse oxidativo induzido após a infecção por vírus pode contribuir para vários aspectos da patogênese, incluindo a inflamação e disseminação viral (Camini et al., 2017). O estresse oxidativo é uma condição que se estabelece quando há uma interrupção/desregulação de sinalização e controle redox causado pelo aumento de ERO e/ou uma redução no sistema de defesa antioxidante (Jones, 2006).

Assim, como o estresse oxidativo está relacionado à patogênese de um grande número de doenças virais e pouco se sabe sobre os aspectos patológicos da infecção pelo MAYV, este estudo teve como objetivo averiguar se o MAYV é capaz de causar estresse oxidativo em células HepG2. Adicionalmente, avaliamos se a silimarina, um composto natural cujos efeitos anti-CHIKV e antioxidante já foram demonstrados, poderia apresentar também ação antiviral contra o MAYV e restaurar o equilíbrio redox celular após a infecção.

Para tal, células HepG2 foram infectadas com o MAYV e em seguida foi avaliado o efeito da infecção no *status* oxidativo celular e nas defesas antioxidantes. Células hepáticas foram escolhidas, pois, o fígado juntamente com o baço, músculos e nódulos linfáticos, são sítios primários da replicação viral após infecção em humanos (Assunção-Miranda et al., 2013). Os resultados obtidos mostraram que o MAYV foi capaz de aumentar a produção de ERO nos tempos iniciais após a infecção e causar estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada e diminuição da relação

glutaciona reduzida/oxidada (GSH/GSSG). Além disso, a infecção alterou a atividade e expressão gênica/proteica das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), bem como o conteúdo intracelular de glutaciona total. Juntos, esses resultados sugerem que o estresse oxidativo induzido pelo MAYV pode ser um importante componente na patogênese desse vírus.

Em seguida, avaliamos a possível atividade antiviral e o efeito protetor da silimarina contra o estresse oxidativo induzido pelo MAYV. Primeiramente a citotoxicidade da silimarina foi testada em células Vero (com o objetivo de comparar os resultados obtidos com os do artigo de Lani et al., 2015) e HepG2. O ensaio de citotoxicidade mostrou que a silimarina possui baixa toxicidade nessas células, com uma concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) > 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Para avaliar a atividade antiviral, diferentes concentrações não citotóxicas da silimarina foram testadas em células Vero e HepG2 infectadas com o MAYV. Os resultados mostraram que, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , em células Vero, e nas concentrações de 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125  $\mu\text{g/mL}$ , em células HepG2, a silimarina significativamente inibiu a infecção pelo MAYV. Em seguida, a atividade da silimarina anti-MAYV foi também testada pelo ensaio de redução de placa. Nas células Vero e HepG2 infectadas com o MAYV e tratadas com 100 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de silimarina, respectivamente, houve redução de cerca de 100% nas Unidades Formadoras de Placas (UFP), 48 hpi.

Por fim, avaliamos se a silimarina poderia restabelecer a homeostase redox após a infecção pelo MAYV em células HepG2. Resumidamente, a silimarina foi capaz de reduzir a produção de ERO em células infectadas bem como o estresse oxidativo induzido pelo vírus. Assim, com os resultados obtidos aqui podemos inferir que o estresse oxidativo possa ser um elemento importante na patogênese do MAYV. Ainda, a capacidade antiviral e antioxidante da silimarina aqui demonstradas garante uma investigação futura sobre o uso desse composto como uma possível abordagem terapêutica para a febre de Mayaro.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Arbovírus

O termo arbovírus origina-se da expressão inglesa *arthropod-borne virus*, os quais são vírus transmitidos ao homem exclusivamente pela picada de um vetor artrópode. Os arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus, sendo pelo menos 545 espécies registradas no *International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates* (ICTV, 2017).

Nos últimos anos tem se observado na mídia a (re) emergência dos arbovírus em diferentes partes do mundo, contudo, assim como outros patógenos microbianos humanos, os arbovírus vêm (re) emergindo há séculos. A principal diferença hoje é que o surgimento e dispersão dos arbovírus são mais rápidos e geograficamente extensivos, possivelmente devido ao crescimento de sistemas de transportes globais, adaptação dos artrópodes à crescente urbanização, alteração da dinâmica da população de hospedeiros e vetores e por fatores ambientais antropogênicos (Donalisio et al., 2017; Gould et al., 2017).

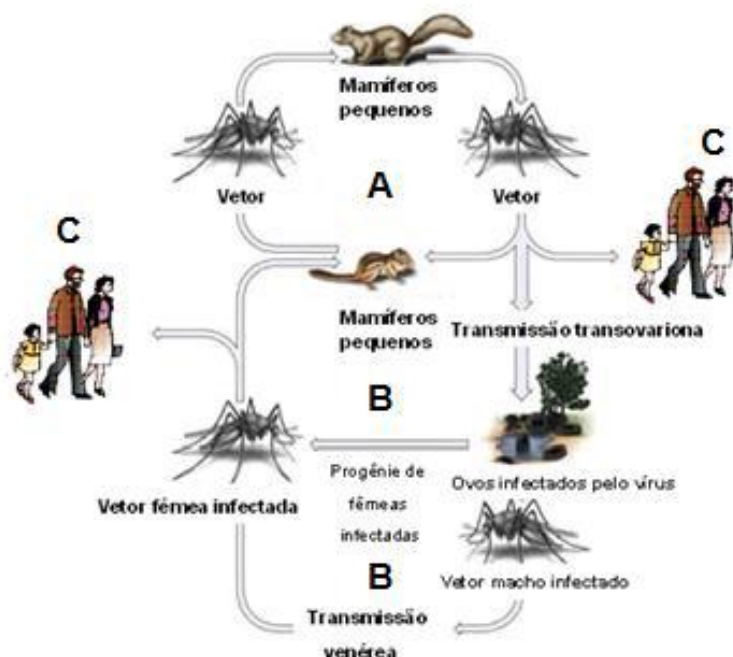
Talvez ainda mais importante do que o próprio patógeno seja o comportamento humano - um dos principais impulsionadores da emergência e transmissão. Vários fatores são relevantes, incluindo aumento da urbanização e invasão de *habitats* animais, desmatamento, práticas agrícolas intensivas, viagens aéreas em massa, práticas de controle de infecção precárias e uso excessivo de agentes antimicrobianos (Hill-Cawthorne & Sorrella, 2016). Essas mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência do vetor, criar novos reservatórios ou induzir os arbovírus a se adaptarem a novos ciclos de manutenção. Além disso, o fato dos arbovírus serem capazes de viajar grandes distâncias e de entrarem em novos países ou continentes aumenta seu potencial de causar uma pandemia, embora cada vírus tenha suas próprias variáveis que colaboram para sua epidemiologia (Morens et al., 2004; Figueiredo, 2007).

Atualmente existem muitas pesquisas tentando avaliar qual a probabilidade de surtos de doenças infecciosas em diferentes regiões do mundo. Estes estudos apontam três requisitos para ocorrer um surto: uma população hospedeira suscetível, um micro-organismo virulento que pode ser transmitido entre hospedeiros e um vetor ou rota de transmissão (Hill-Cawthorne & Sorrella, 2016).

Entender o surgimento e disseminação de micro-organismos é crítico para programas efetivos de saúde pública. Um dos grandes desafios é ter a capacidade de realizar a vigilância genômica em tempo real e identificar precocemente o surgimento de novas síndromes ou *clusters* de sintomas em uma comunidade. Isso pode ser alcançado examinando o próprio patógeno (por exemplo, avaliação de risco genômico - mutações que podem predispor a propagação ou virulência); identificando a presença de reservatórios e vetores animais e sua "competência" para transportar patógenos específicos; e imunidade populacional (Hill-Cawthorne & Sorrella, 2016).

Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos e carrapatos. Flebotomíneos (*Phlebotomus*, *Sergentomya* e *Lutzomya*), maruins ou mosquito pólvora (*Culicoides*), percevejos (*Oeciacus*) e possivelmente ácaros, também são capazes de transmitir esses micro-organismos alimentando-se do sangue de hospedeiros vertebrados, principalmente aves e mamíferos roedores. O ciclo se fecha pela infecção de novos artrópodes que se alimentam de animais virêmicos. A transmissão vertical, através da via transovariana, e a transmissão venérea também podem ocorrer (Figura 1) (WHO, 1985; Figueiredo, 2007; Vasconcelos et al., 2009). Os vírus mais importantes para a saúde humana são aqueles transmitidos por *Culicidae*, principalmente dos gêneros *Culex* e *Aedes* (Weaver & Reisen, 2010).

Representando quase 30% de todas as doenças infecciosas emergentes nas últimas décadas, as arboviroses estão distribuídas em todo o mundo (Jones et al., 2008). São causadas na sua maioria por vírus com genoma constituído por RNA, que pode ser segmentado ou não e apresentar-se com uma ou mais fitas (Monath, 1988). De acordo com Weaver (2006), o fato do genoma destes vírus serem quase que exclusivamente de RNA pode ser um requisito importante para sua plasticidade em obter sucesso em ambientes de hospedeiros dinâmicos. Estima-se que as taxas de erro da RNA polimerase RNA dependente (RpRd) variam de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  erros/nucleotídeo/ciclo de replicação (Domingo & Holland, 1994; Drake & Holland, 1999), o que em conjunto a níveis rápidos e elevados de replicação viral permitem a estes vírus uma adaptação melhor e mais rápida aos diferentes ambientes de hospedeiros.



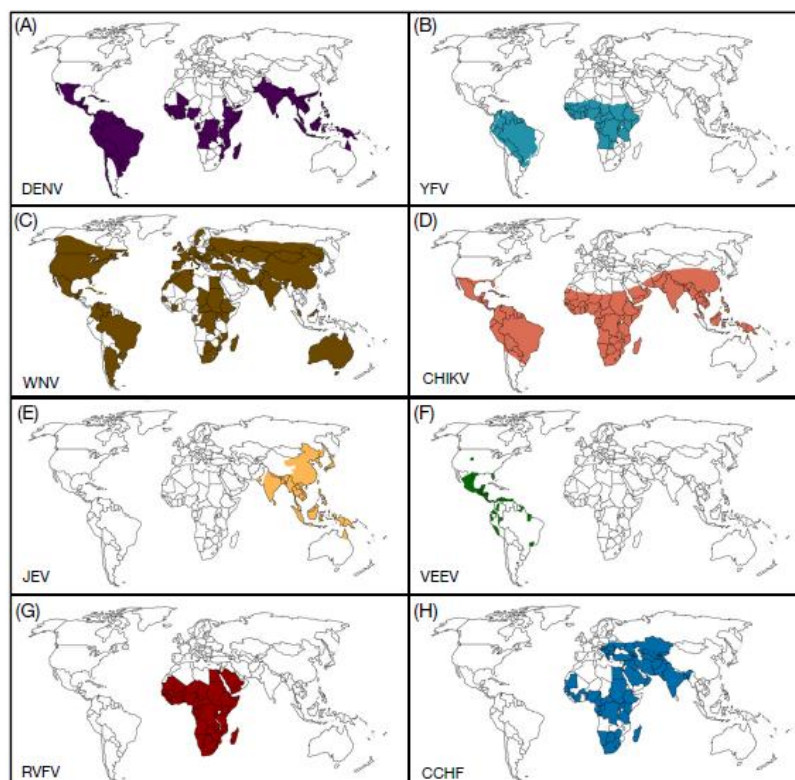
**Figura 1: Ciclo biológico dos arbovírus.** A – Ciclo de amplificação em mamíferos, no qual a fêmea infectada poderá transmitir o vírus a pequenos mamíferos que desenvolvem uma viremia alta e curta, podendo levar à infecção de novos artrópodes hematófagos. B – Ciclo reservatório, no qual ocorre a transmissão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

Os arbovírus são classificados em grupos antigênicos constituídos por dois ou mais vírus que demonstram relações antigênicas um com o outro, de acordo com o critério sorológico estabelecido por Casals em 1957 (Cruz & Vasconcelos, 2008). Dessa forma, em relação às propriedades físico-químicas, a maioria dos arbovírus se distribui em cinco famílias: *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae*. No entanto, nem todos os membros dessas famílias são necessariamente arbovírus. Além disso, reconhece-se ainda a existência de outros arbovírus integrantes das famílias *Arenaviridae*, *Herpesviridae* e *Coronaviridae* (Travassos da Rosa et al., 1986).

Existem cerca de 150 espécies de arbovírus capazes de provocar doença em humanos, sendo responsáveis por significativos problemas de saúde pública (Mayer et al., 2016). Entre esses, 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 *California encephalitis virus* (CEV) (Kuno & Chang, 2005; Napoleão-Pego et al., 2014).

Os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, principalmente em regiões temperadas e tropicais por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis (Figura 2). Nos trópicos, os vetores coexistem com os hospedeiros vertebrados em todas as estações do ano. Nos países de clima temperado, o ciclo de transmissão é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou verão (Napoleão-Pego et al., 2014; Travassos da Rosa et al., 1997).

O Brasil, como um país tropical de grande extensão territorial, com mais de 1/3 do seu território recoberto por florestas tropicais ou outros ecossistemas naturais, apresenta condições ideais para a ocorrência de diversas arboviroses as quais são mantidas em uma grande variedade de ciclos zoonóticos. A Amazônia brasileira é uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, não só devido às condições climáticas favoráveis, mas também à grande diversidade da fauna e flora. Nessa região, durante os anos de 1954 a 2006, foram isolados pelo menos 196 tipos de arbovírus, distribuídos em diversas famílias, sendo a maioria de patogenicidade desconhecida ao homem (Travassos da Rosa et al., 1997; Cruz & Vasconcelos, 2008; Vasconcelos, 2009).



**Figura 2: Distribuição global de algumas arboviroses importantes.** (A) DENV, vírus da dengue; (B) YFV, febre amarela; (C) WNV, vírus do Nilo Ocidental; (D) CHIKV, vírus Chikungunya; (E) JEV, vírus da encefalite japonesa; (F) VEEV, vírus da encefalite equina venezuelana; (G) RVFV, vírus da febre do vale do Rift; (H) CCHF, febre hemorrágica da Crimeia-Congo. Fonte: Iranpour et al., 2016.



As formas clínicas das arboviroses humanas variam conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção e também das condições imunológicas do hospedeiro. A maioria apresenta uma evolução benigna, porém algumas podem evoluir para quadros clínicos graves. De maneira geral, as manifestações clínicas 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, cefaleia, 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 e choque combinado com 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, convulsões e problemas na coordenação (Pinheiro et al., 1986; Travassos da Rosa et al., 1997; Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2003; Henning, 2004; Zacks & Paessler, 2010; Suhrbier et al., 2012).

O que determina cada uma das manifestações clínicas das arboviroses são fatores como inóculo, tempo de exposição, cepa 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).

Deve-se salientar que em seus *habitats* naturais, os arbovírus são mantidos em equilíbrio em seu ciclo biológico, porém mudanças ambientais, como as já mencionadas acima, causam um desequilíbrio nesse ecossistema e expõem a população a agentes infecciosos emergentes. Durante a infecção de múltiplos e distintos organismos, o vírus pode ser selecionado e produzir uma linhagem mais virulenta ou, melhor adaptada aos seus hospedeiros e vetores, contribuindo assim para uma maior probabilidade de epidemias e doenças virais mais frequentes e mais importantes em humanos (Figueiredo, 2007).

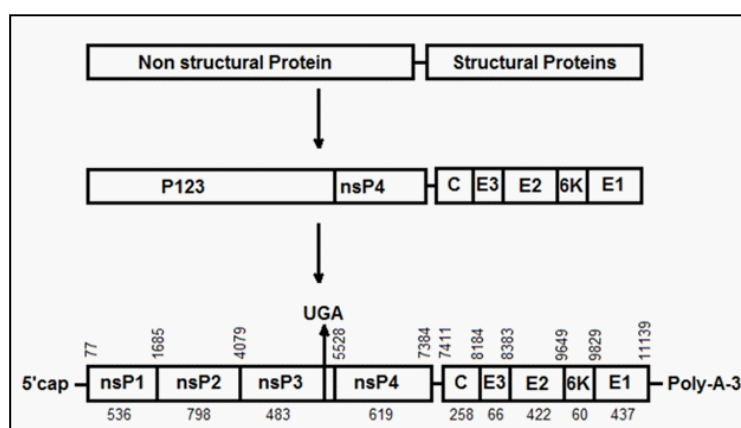
Como observado, os arbovírus são um grupo muito diversificado, e no Brasil predominam os arbovírus pertencentes às famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae* (Figueiredo, 2015). A família *Togaviridae* possui algumas das espécies de vírus mais importantes no mundo, tais como o CHIKV, EEEV, RRV, SINV, WEEV, VEEV, MAYV, entre outros.

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

A família *Togaviridae* pertence ao grupo IV da Classificação Baltimore de Vírus, de 1971. Ela é composta atualmente por 32 espécies de vírus, divididos entre 2 gêneros: o gênero *Alphavirus*, que apresenta 31 espécies, e o gênero *Rubivirus*, que possui apenas 1 espécie de vírus (ICTV, 2017). As doenças associadas a esta família incluem artrite, encefalite e síndrome da rubéola congênita. Os vírus mais estudados deste gênero são o SINV e o CHIKV, portanto, a maioria dos conhecimentos atuais baseia-se em estudos com esses vírus.

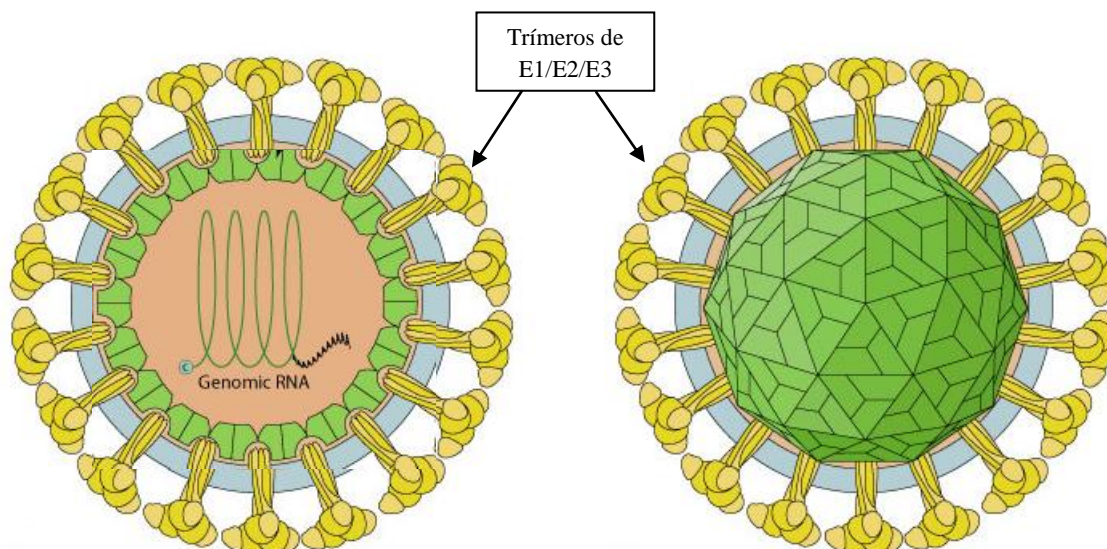
O genoma dos vírus da família *Togaviridae* é composto por RNA não segmentado, fita simples, senso positivo, com 10.000-12.000 nucleotídeos. Os vírus são partículas esféricas, envelopadas, com cerca de 70 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo é icosaédrico, constituído por 240 monômeros (Schmaljohn & McClain, 1996; King et al., 2011).

O genoma viral é dividido em duas janelas abertas de leitura (ORF), separadas por uma região intergênica. A primeira ORF compreende 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 ORF codifica as proteínas estruturais C (capsídeo), E3, E2, E1 e 6K, sob o controle de um RNA subgenômico referido como 26S. O RNA 26S é transcrito a partir de um intermediário de cadeia negativa e é idêntico a um terço do RNA genômico (Strauss & Strauss, 1994; Napoleão- Pego et al., 2014; Mota et al., 2015). A organização do genoma pode ser observada na Figura 3.



**Figura 3: Representação esquemática 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 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, respectivamente (Figura 4) (Kielian et al., 2000). Alguns *Alphavirus* apresentam uma terceira proteína (E3) de peso molecular de 10.000 a 12.000 daltons, entre eles o vírus *Semliki Forest* (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 & McClain, 1996; Napoleão-Pego et al., 2014).



**Figura 4: Estrutura dos *Alphavirus*.** Fonte: [https://viralzone.expasy.org/625?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species).

A maioria dos *Alphavirus* é transmitida aos seres humanos por artrópodes, excluindo-se apenas o *Salmon pancreas disease virus* (SPDV) e o *Southern elephant seal virus* (SESV). Eles 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 aos seres humanos é feita através da picada de mosquitos principalmente do gênero *Culex spp*, *Haemagogus spp* e *Aedes spp*, 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 (Gould et al., 2010).

As alfaviroses podem ser classificadas de maneira geral em dois grupos baseados em sua combinação filogenética, distribuição geográfica e na doença clínica por eles causada. O primeiro grupo é o das viroses que causam encefalites, também conhecidas como viroses do Novo Mundo (vírus da *Encefalite Equina Oriental, Ocidental ou Venezuelana*). Possuem o sistema nervoso central como um alvo claro, causando degeneração e necrose dos neurônios. O segundo grupo, também conhecido como viroses do Velho Mundo, causam artralgias e artrites (CHIKV, RRV, MAYV e SINV). 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 & McClain, 1996, Zacks & Paessler, 2010). As principais alfaviroses estão descritas na Tabela I.

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. A artralgia e artrite características dessas doenças virais envolvem principalmente tornozelos, pulsos, joelhos e todas as pequenas articulações das extremidades. Em casos mais graves ocorre o inchaço das articulações e sinais e sintomas reumáticos que podem persistir por semanas, meses ou até mesmo anos após a doença aguda (Assunção-Miranda et al., 2013). Em um estudo realizado por Sissoko et al. (2009), 15 meses após o início da infecção pelo CHIKV, apenas 43% dos pacientes que apresentavam poliartrites crônicas obtiveram remissão completa dos sintomas, com mais da metade dos pacientes ainda com sintomas de artrite reumática.

Em 2015, pelo menos 9 arbovírus patogênicos para humanos foram responsáveis por epidemias ou surtos no Brasil, dentre esses, os *Alphavirus* CHIKV e MAYV. O CHIKV foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2013 e já se expandiu para várias regiões do país. O MAYV foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1955, no estado do Pará, e atualmente é

considerado altamente endêmico na região Amazônica, causando casos esporádicos ou surtos de doença febril em humanos, com artropatias (Figueiredo, 2015).

**Tabela I: Principais alfaviroses no mundo**

<b>Vírus</b>	<b>Síndrome clínica</b>	<b>Vetor</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Distribuição</b>
EEEV	Encefalite	Mosquito	Pássaro	Américas
WEEV	Encefalite	Mosquito	Pássaro	América do Norte
EEV	Doença febril, encefalite	Mosquito	Roedores, cavalos	Américas
CHIKV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Primatas, humanos	África, Índia, Sudeste da Ásia, Américas
MAYV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Primatas, humanos	Américas
ONNV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Primatas não humanos	África
RRV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Mamíferos, humanos	Austrália
SINV	Doença febril, erupção cutânea, artralgia	Mosquito	Pássaros	Norte da Europa, África, Ásia e Austrália
SFV	Doença febril, erupção cutânea, encefalite	Mosquito	Pássaros	África

Fonte: Adaptado de Schmaljohn & McClain, 1996.

### 2.3 – *Mayaro virus* (MAYV)

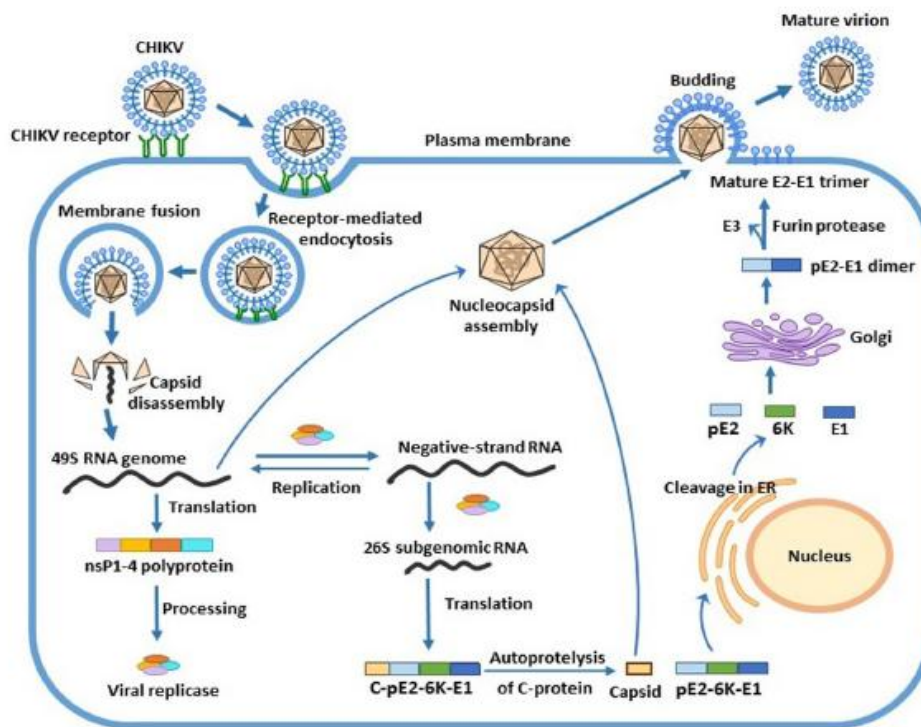
O MAYV foi primeiramente isolado em 1954 no sangue de cinco trabalhadores rurais febris, próximo à cidade de Mayaro (por isso o nome do vírus), em Trinidad e Tobago. Após o primeiro isolamento do MAYV acreditava-se que ele era restrito às áreas de florestas da região tropical da América do Sul e Central. 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).

O MAYV apresenta, até o momento, três genótipos conhecidos. 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 o terceiro é o genótipo N, descoberto em 2015 em um surto do MAYV na Venezuela. Parece haver baixa diversidade genética entre os isolados de cada genótipo, por isso, acredita-se que sejam mantidos em ciclos enzoóticos independentes (Powers et al., 2006; Napoleão-Pego et al., 2014; Auguste et al., 2015).

Em relação ao ciclo replicativo do MAYV, ainda não se conhecem muitas características específicas para esse vírus, por isso considera-se em sua maioria o ciclo replicativo geral dos *Alphavirus*. A Figura 5 descreve o ciclo replicativo do CHIKV, vírus intimamente relacionado ao MAYV.

Sabe-se que o ciclo dos *Alphavirus* é um ciclo citoplasmático rápido, que se completa em aproximadamente 4 horas. A proteína viral E2 medeia a ligação do CHIKV ao seu receptor na superfície celular. O vírus entra na célula por endocitose, seja pela fusão com componentes da membrana da superfície celular ou pela ligação do receptor e internalização. A endocitose mediada pelo receptor é o modo predominante de entrada viral, muitas vezes mediada por clatrina. Há evidências crescentes de que os *Alphavirus* podem infectar células independentemente da endocitose mediada por clatrina, empregando uma via de entrada diferente ou usando vários caminhos alternativos (Abdelnabi et al., 2015; Mota et al., 2015).

Dentro do endossoma, o pH baixo desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, levando à liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. O nucleocapsídeo libera o genoma viral que é traduzido para produzir as proteínas não estruturais virais (nsP1-4). Após o processamento, as proteínas não estruturais completam-se para formar a replicase viral, que catalisa a síntese de uma cadeia de RNA senso negativo para servir como molde para síntese dos RNAs genômico e subgenômico (26S). O RNA subgenômico (26S) é traduzido para produzir a poliproteína estrutural, que é então clivada para produzir as proteínas estruturais individuais, seguida da montagem dos componentes virais. A partícula viral montada é liberada por brotamento através da membrana plasmática, de qual adquire o envelope com glicoproteínas virais incorporadas (Abdelnabi et al., 2015; Mota et al., 2015).



**Figura 5: Representação esquemática do ciclo de replicação do CHIKV.** Fonte: Abdelnabi et al., 2015.

A febre Mayaro tem sido reportada em diferentes países como Peru, Brasil, Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela, Colômbia, Equador, Panamá, Bolívia, Costa Rica, Guatemala e México (Schaeffer et al., 1959; Karabatsos et al., 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; Mota et al., 2015). 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).

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, 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 em 1991, houve surto na cidade de Peixe, no estado de Tocantins. Entre os anos de 2007 e 2008, das 600 amostras de sangue coletadas de moradores febris da cidade de Manaus, 33 foram positivas para a presença do vírus (Aitken et al., 1960;

Pinheiro et al., 1981; Vasconcelos et al., 1998; Mourão et al., 2012). A Figura 6 mostra a distribuição dos casos da febre Mayaro e também de países com evidências da circulação do vírus.



**Figura 6: Distribuição do MAYV nas Américas.** A figura mostra em vermelho as regiões em que há casos reportados de febre Mayaro; em azul são as regiões em que há evidências da circulação do MAYV e em cinza são as regiões em que não há evidências ou não há dados disponíveis em relação à circulação do MAYV. Fonte: Mota et al., 2015.

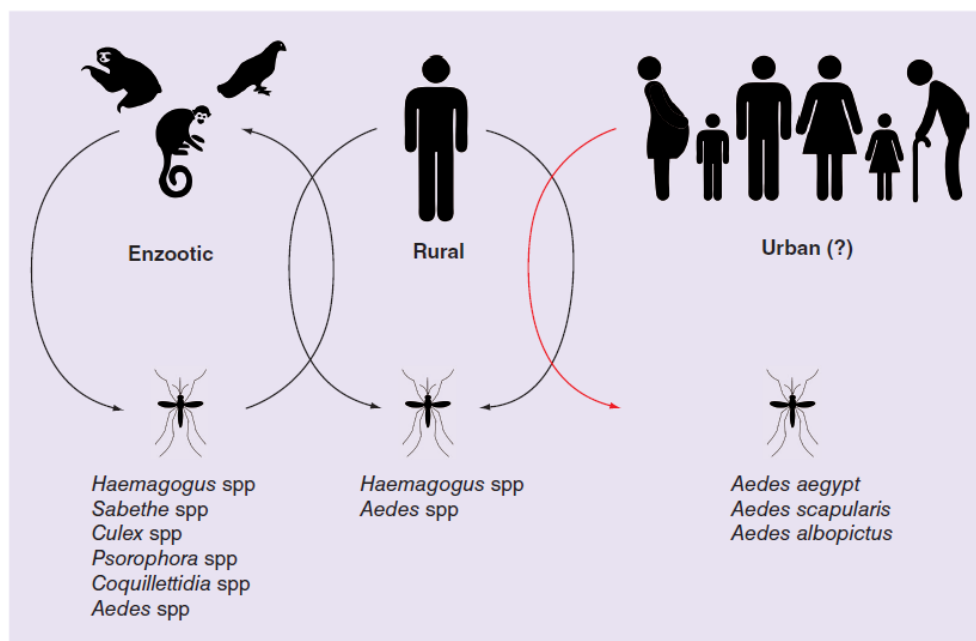
O vírus tem sido encontrado principalmente na região Norte do Brasil, mas também já houve surto na região Centro-Oeste na cidade de Itarumã, estado de Goiás, em 1987. Além disso, o vírus foi isolado de três pacientes paulistanos que foram infectados em uma visita à cidade de Camapuã, estado de Mato Grosso 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).

Segundo o Ministério da Saúde (2016), entre dezembro de 2014 a janeiro de 2016 foram notificados 343 casos suspeitos de humanos infectados pelo MAYV no Brasil. Esses casos apresentaram-se distribuídos em onze estados das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste,



sendo que apenas Goiás apresentou 53% dessas notificações. Do total de ocorrências, 70 foram confirmados, 29 descartados e 244 ainda estavam sob análise. Esses dados são importantes, pois, retratam apenas aqueles casos que foram avaliados/testados para o MAYV, ainda existem muitos casos que simplesmente não são investigados para o MAYV e aqueles que apresentam diagnóstico equivocado para outras arboviroses.

Como o MAYV possui 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 7). 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*, *Coquillettida 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, Mota et al., 2015).



**Figura 7: Ciclo de transmissão do MAYV.** As setas pretas indicam os ciclos mais prováveis e em vermelho um possível ciclo urbano. Fonte: Mota et al., 2015.

A infecção humana pelo MAYV, baseada nos dados epidemiológicos atuais, é considerada acidental e apresenta um risco maior para aqueles indivíduos expostos às áreas de

florestas. A transmissão urbana tem sido considerada, principalmente depois que estudos demonstraram que o mosquito *Aedes aegypti*, tipicamente urbano e vetor do DENV, ZIKV e CHIKV, pode ser um potencial vetor do MAYV (Tesh et al., 1999; Powers et al., 2006; Azevedo et al., 2009; Long et al., 2011).

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 transmiti-lo contribuem para o seu potencial de emergência. 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 (Esposito & Fonseca, 2017; Hotez & Murray, 2017).

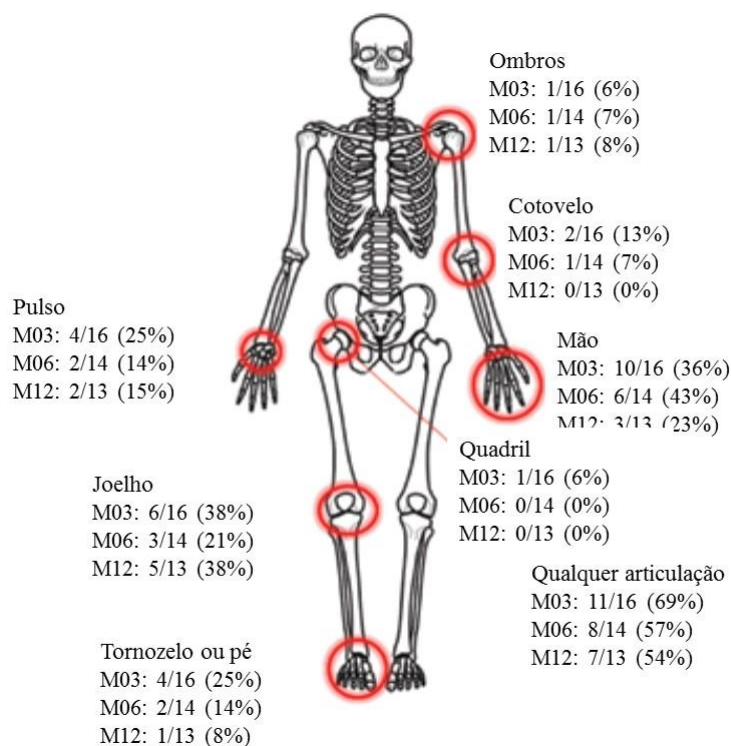
Devido a toda essa importância para a saúde pública, o MAYV foi incluído, em 2011, pelo Ministério da Saúde, na lista de doenças de notificação compulsória, ou seja, aquelas que devem ser comunicadas obrigatoriamente diante de suspeitas (Ministério da Saúde, Portaria Nº104, de 25 de Janeiro de 2011).

No entanto, como a febre Mayaro atinge regiões pobres e tem pouca atenção governamental, a doença ainda é muito negligenciada. Além disso, por apresentar uma limitada vigilância em áreas endêmicas e como suas manifestações clínicas são muito semelhantes às da dengue, chikungunya e zika, acredita-se que deve haver muitos casos de subnotificação ou até mesmo diagnósticos errados da febre Mayaro. Vieira et al., (2015) examinaram soros de pacientes clinicamente diagnosticados com dengue durante um surto no Brasil e descobriram que 20% eram positivos para o vírus da dengue e que 3% apresentaram-se positivos para o MAYV.

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 persistem por três dias. Em alguns casos, há a presença de náusea, tosse, dor de garganta, dor abdominal, congestão nasal, prurido e sangramento 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 várias semanas, meses ou anos. A artralgia começa com o início dos demais sintomas, e pode ser altamente dolorosa e incapacitante afetando mãos, punhos, cotovelos, pés, joelhos e demais articulações menores (Figura 8). Os pacientes podem apresentar também ligeiras 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).



**Figura 8: Prevalência do envolvimento de articulações na infecção pelo MAYV.** Dados foram obtidos de pacientes após diferentes meses de infecção, na região da bacia 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.

Geralmente, a febre Mayaro é uma morbidade 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 muito incapacitante, a artralgia causa uma elevada perda de produtividade e sobrecarga dos serviços médicos públicos (Tesh et al., 1999; Theilacker et al., 2013).

Atualmente, não há estudos relacionados à patogênese 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 pelos nódulos linfáticos e pela 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 imune, a virulência da amostra viral e persistência do vírus são determinantes na patogênese da infecção dos *Alphavirus*. A gravidade da doença e persistência dos sintomas estão associadas à extensão da multiplicação 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 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 (De 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 descrevem casos isolados ou surtos de doença em humanos, outros mostram 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 é investigar o possível envolvimento do estresse oxidativo na infecção pelo MAYV, uma vez que a patogênese de várias doenças virais tem sido relacionada à ocorrência desse evento.

## 2.4 – Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) 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 hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1990; Halliwell, 1992). Os radicais livres são produzidos em situações fisiológicas 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 e 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 (Moncada et al., 1991; Dusting & Macdonald, 1995; Ignarro, 1998).

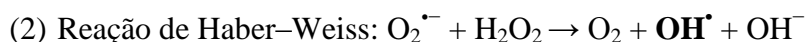
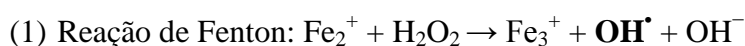
O termo coletivo “Espécies Reativas de Oxigênio” inclui não somente os radicais livres, mas também outros átomos e moléculas muito reativas, que não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Halliwell, 1992) (Tabela II).

**Tabela II:** Algumas espécies reativas e suas meias-vidas.

Espécie Reativa de Oxigênio	Meia-vida (segundos)
OH <sup>•</sup> Radical hidroxila	10 <sup>-9</sup>
HOO <sup>•</sup> Radical hidroperoxila	10 <sup>-8</sup>
RO <sup>•</sup> Radical alcoxila	10 <sup>-6</sup>
ROO <sup>•</sup> Radical peroxila	7
ONOO <sup>•</sup> Peroxinitrito	0,05 - 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Peróxido de hidrogênio	Variável
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> Radical superóxido	Variável
O <sub>2</sub> Oxigênio singleto	10-5
NO Radical óxido nítrico	1 - 10
HOCl Ácido hipocloroso	Estável

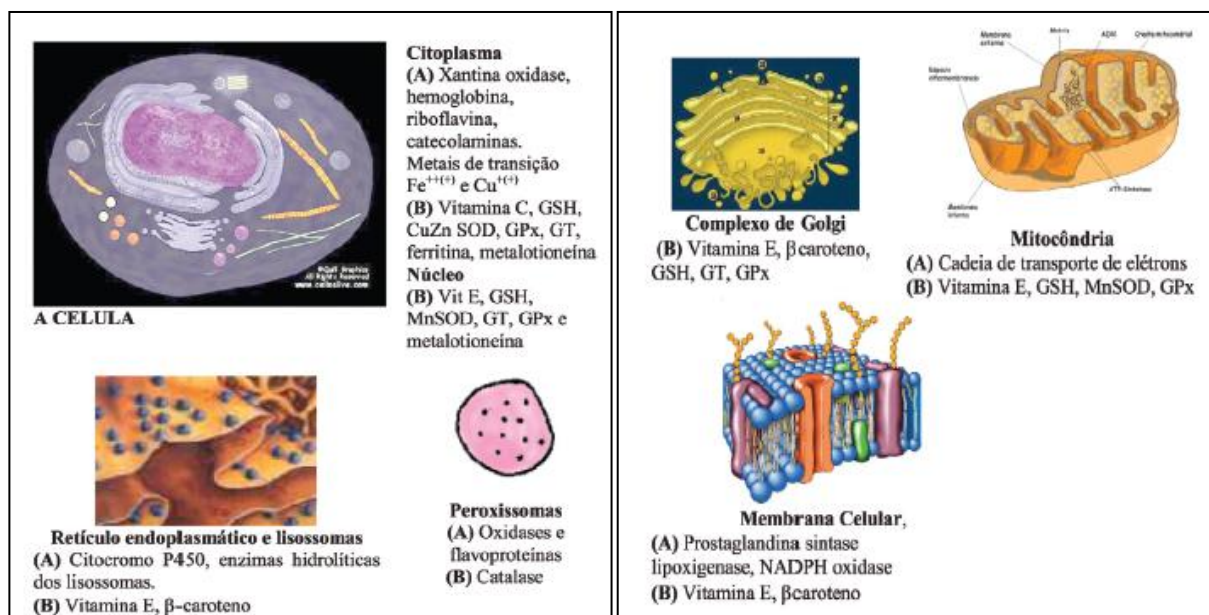
R é um lipídeo, por exemplo, o linoleato. Fonte: Jordão et al., 1998.

O ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, 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 ERO "secundárias" (Valko et al., 2005). A espécie reativa considerada a mais potente em sistemas biológicos é o OH<sup>•</sup>, 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<sup>•</sup> apresenta uma alta reatividade, o que o torna muito nocivo, além de possuir uma meia vida muito curta, aproximadamente 10<sup>-9</sup> segundos (Pastor et al., 2000).



De acordo com Beckman & Ames (1997), as ERO são formadas em resposta a estímulos extracelulares e intracelulares. Estima-se que uma célula humana é exposta a cerca de 1,5×10<sup>5</sup> fontes de produção por dia, a partir dos radicais hidroxila e de 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<sub>2</sub> mitocondrial consumido, cerca de 1% a 3% é desviado para a formação de ERO, e esse desvio, acredita-se, ser tecido e espécie dependentes (Stowe & Camara, 2009).

Outras importantes fontes de ERO (Figura 9) incluem o sistema do citocromo P450, enzimas oxidantes (como xantina oxidase endotelial, NADPH oxidases e mieloperoxidasas), reações de auto oxidação de substâncias endógenas (como catecolaminas ou substratos exógenos como os xenobióticos), oxidação de produtos reduzidos acumulados, por exemplo, nos processos do metabolismo anaeróbico, ou ainda, pelo grupo heme das proteínas (Kovacic et al., 2005; Bedard & Krause, 2007; Altenhofer, 2012; Kleikers et al., 2012; Lenaz, 2012).



**Figura 9: A célula como fonte de ERO.** (A) Fontes celulares de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio e outras, por ação de várias enzimas. (B) Distribuição dos antioxidantes, enzimas de desintoxicação e proteínas de ligação a metais de transição que compreendem o sistema de defesa dentro das membranas e organelas celulares. Fonte: Adaptado de Vasconcelos et al., 2007.

Os neutrófilos podem gerar grandes quantidades de ERO via NADPH-oxidase para destruição de bactérias, vírus e outros agentes infecciosos (Pyne, 1994). A produção de  $H_2O_2$  pode ser substancialmente aumentada nos peroxissomos quando uma grande quantidade de ácidos graxos de cadeias longas é metabolizada via  $\beta$ -oxidação (Chance et al., 1979). Outras fontes de ERO são as hemácias na passagem de  $oxiHbFe^{2+}$  para  $desoxiHbF^{3+}$ , a via de formação do ácido araquidônico, entre outras (Kuehl & Egan, 1980; Gohil et al., 1988).

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 poliinsaturados na membrana celular podem resultar no radical peroxila de ácido graxo (R-COO), que apresenta a capacidade de atacar cadeias laterais de ácidos graxos adjacentes e iniciar a produção de outros radicais lipídicos. Esses 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 transtornos 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 poliinsaturados; outra via de peroxidação não enzimática, que envolve a participação de ERO, espécies reativas de nitrogênio, metais de transição e outros radicais livres (Al Mehdi et al., 1993; Porter et al., 1995).

Os efeitos benéficos das ERO 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 (Valko et al., 2007). Como efeitos prejudiciais, as ERO causam potenciais danos biológicos, que afetam estruturas celulares, incluindo lipídeos de membranas, proteínas e ácidos nucleicos (Kovacic & Jacintho, 2001; Valko et al., 2001; Ridnour et al., 2005). Normalmente, isso ocorre em sistemas biológicos quando há uma superprodução de ERO de um lado e uma deficiência nos sistemas de defesas antioxidantes de outro lado.

Uma definição clássica de estresse oxidativo é a de Sies & Cadenas (1985). Segundo eles, o estresse oxidativo “é um desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes, em favor dos oxidantes”. No entanto, 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 ERO produzido pode causar danos ao DNA, lipídeos e proteínas, levando à perda da integridade e funcionalidade celular. Esse dano oxidativo acumula-se durante o ciclo de vida, e acredita-se que desempenha um papel chave no desenvolvimento de doenças dependentes da idade tais como câncer, arteriosclerose, artrite, doenças neurodegenerativas, entre outras (Halliwell & Gutteridge, 1999). Dessa forma, para prevenir a produção de ERO e manter a homeostase celular, existe o sistema de defesa antioxidante que, sob condições fisiológicas, não permite ação prejudicial excessiva das ERO (Nakashima et al., 2003; Forman & Dickinson, 2004; Armogida et al., 2012).

## **2.5 – 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 ERO (Ratnam et al., 2006).

O sistema de defesa antioxidante se divide em enzimático e não enzimático. Entre os antioxidantes não enzimáticos, muitos 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), carotenoides, 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 Glutathione peroxidase. As 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/Zn SOD (SOD1); a mitocondrial, Mn SOD (SOD2); e a extracelular, Cu/Zn SOD (SOD3) (Perry et al., 2010).

A SOD1 é a principal isoforma intracelular, sendo responsável por 80% da proteína total. Estudos mais antigos relataram que a SOD1 é principalmente citosólica (Slot, 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):



Essas isoformas 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 ERO dentro da célula (Forman, 2007; Liu et al., 2008).

Em condições inflamatórias, a produção de superóxido é aumentada, pois ele desenvolve um importante papel na resposta imune de mamíferos. O superóxido tem ação antimicrobiana e facilita a morte de micro-organismos invasores, pois através da oxidação lipídica a membrana plasmática é degradada (Guerra et al., 2007). Mas em excesso, o superóxido é muito danoso às células. Ele pode interagir com o óxido nítrico ( $NO^*$ ) e formar o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é um poderoso pró-oxidante capaz de afetar células vizinhas (Beckman & Liaudet, 2007). Outra enzima que atua em conjunto com a SOD é a CAT, que converte o peróxido de hidrogênio produzido pela SOD em  $H_2O$  e  $O_2$ .

A CAT é uma enzima homotetrâmera em que cada monômero (62.5 kDa) contém um grupo heme responsável pela atividade enzimática (Nagem et al., 1999). Ela 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, portanto, é muito importante no contexto celular, pois se sabe que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo e ainda gerar o radical OH<sup>•</sup> na presença de metais de transição (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> podem ser influenciadas por diversos fatores: tempo de exposição, concentração do 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 de 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).

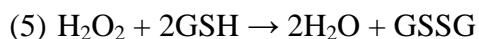
A CAT apresenta uma das mais altas taxas de atividade para todas as enzimas, sendo que uma molécula de CAT pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio a cada minuto (Valko et al., 2006), de acordo com a reação (4):



Outro sistema que converte o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular é o sistema de defesa da glutathiona. A glutathiona 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 2 mM e 10 mM em eritrócitos e hepatócitos humanos, respectivamente (Joseph et al., 1997). Constitui um sistema de defesa endógeno muito importante que tem sido implicado na modulação imune, respostas inflamatórias, sinalização redox, regulação da proliferação celular, apoptose e respiração mitocondrial (Deneke & Fanburg, 1989; Evans et al., 1991; Brown, 1994; Dröge et al., 1994).

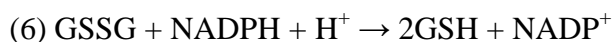
Na célula, cerca de 90% da glutathione está localizada no citoplasma, 10% na mitocôndria e uma pequena porcentagem no retículo endoplasmático (Hwang et al., 1992). Aproximadamente 85% da glutathione celular total está livre, enquanto que o resto está ligado às proteínas (Sies, 1999).

A glutathione apresenta-se em mais de 90% do seu total como glutathione reduzida (GSH) e o restante na forma de glutathione oxidada (GSSG). A GSH é oxidada à GSSG pela glutathione peroxidase (GPx), que também reduz o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à H<sub>2</sub>O durante períodos de estresse oxidativo (conforme a reação 5) e é revertida para a forma reduzida pela glutathione redutase (GR) (Kinnula et al., 1995).



A razão GSH/GSSG é utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos sendo crucial na manutenção da homeostase intracelular (Rotruck et al., 1973; Meister & Anderson, 1983).

A GR não age diretamente na remoção das ERO, porém é responsável pela regeneração da glutathione na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (reação 6) (Halliwell & Gutteridge, 1989).

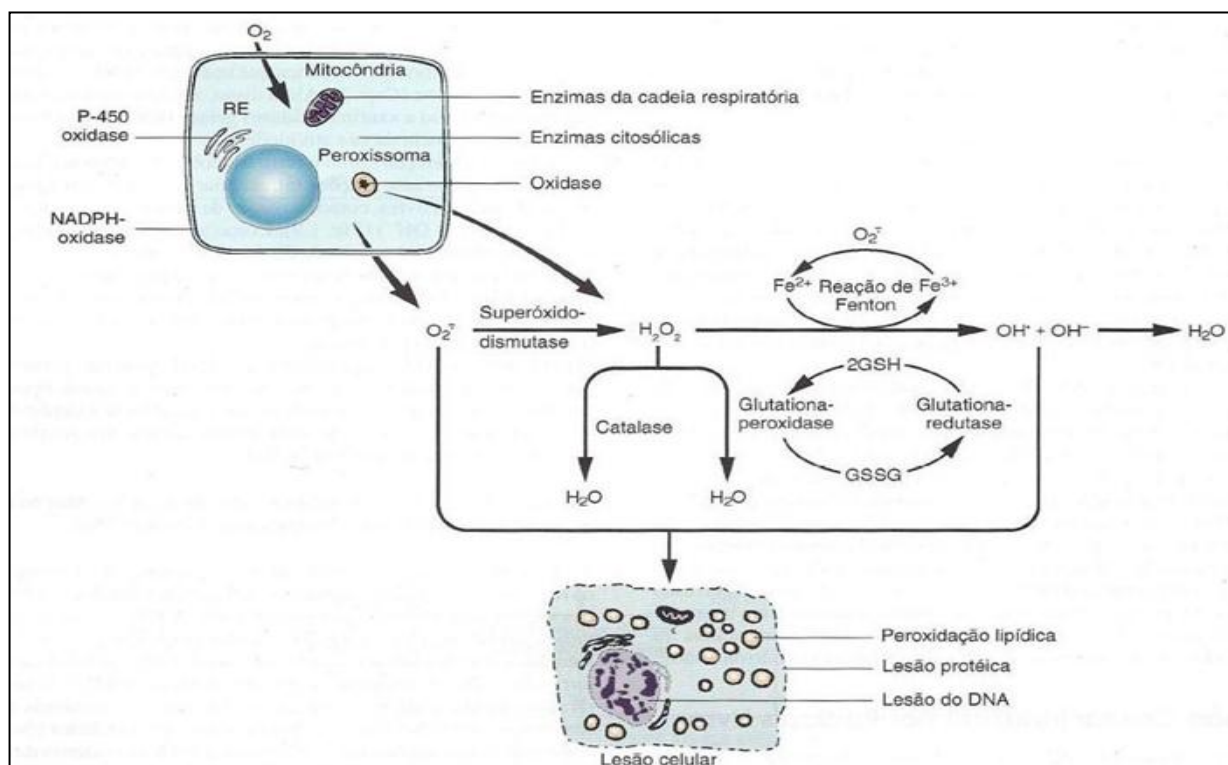


Essa capacidade de reciclar a glutathione faz com que esse ciclo seja essencial para o mecanismo de defesa antioxidante da célula e evite o esgotamento dos tíóis celulares (Heffner & Repine, 1989), sendo que para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão GSH/GSSG deve ser mantida em níveis altos (Sies & Moss, 1978; Halliwell & Gutteridge, 2007).

A capacidade redutora da glutathione é determinada pelo grupamento sulfidril (-SH), presente na cisteína. O fígado sintetiza a glutathione 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 peroxissomos. Isso faz com que a glutathione seja importante na defesa contra o

estresse oxidativo gerado fisiologicamente ou patologicamente (Fernández-Checa et al., 1997; Garcia-Ruiz & Fernández-Checa, 2006).

Uma vez que o aumento do  $H_2O_2$  inativa lentamente a SOD, e que a CAT e GPx reduzem o  $H_2O_2$  à  $H_2O$ , estas, ao reduzirem o  $H_2O_2$  conserva a SOD, e esta, reduzindo o superóxido, por sua vez, conserva a CAT e a GPx. Baixos níveis de 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). Na Figura 10 é possível observar as principais espécies reativas e alguns mecanismos enzimáticos.



**Figura 10: 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. E a partir daí ocorrem diferentes reações catalisadas pelas principais enzimas antioxidantes. Fonte: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Super%C3%B3xido+Dismutase&lang=3](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Super%C3%B3xido+Dismutase&lang=3).

## 2.6 - Estresse Oxidativo e Doenças Virais

Durante as infecções virais, é de particular relevância o fato das espécies reativas estarem intimamente envolvidas na regulação metabólica e fisiológica, uma vez que os vírus dependem dos mecanismos de biossíntese de suas células hospedeiras. Por seu papel na ativação das células (Burdon, 1995), as ERO podem facilitar ou até mesmo promover a

replicação desses micro-organismos, dependendo da célula e vírus envolvidos (Albrecht et al., 1992; Pace & Leaf, 1995; Peterhans, 1997a, Gullberg et al., 2015).

A princípio, as ERO tentam combater a infecção viral e são vistas como um mecanismo de proteção da célula hospedeira. Sabe-se que baixos níveis de ERO ativam a proliferação celular e a maioria dos vírus multiplica-se melhor em células que estão se proliferando. No entanto, com o progresso da infecção, mais ERO são formadas a fim de se 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. Portanto, o estresse oxidativo causado por infecções virais pode contribuir para vários aspectos da patogênese, incluindo resposta inflamatória, morte celular, entre outros (Peterhans, 1997a, b; Jacobson, 1996; Reshi et al., 2014; Camini et al., 2017).

O efeito das ERO nas funções celulares depende da quantidade de ERO e do tempo em que a célula foi exposta a elas (Albrecht et al., 1992; Burdon, 1995; Pace & Leaf, 1995; Reshi et al., 2014). Os vírus, em geral, variam na indução de ERO, mas compartilham uma via patogênica comum, acentuando a produção de ERO e depleção de antioxidantes (Stehbens, 2004; Camini et al., 2017).

Os oxidantes induzidos pela infecção viral incluem NO, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup> e seus subprodutos (como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o que pode contribuir para a modulação das respostas celulares, a regulação da multiplicação viral, a defesa do hospedeiro e a patogênese viral (Zhang et al., 2014). Como as ERO estão intimamente relacionadas às células, mudanças nessas espécies em diferentes vias de sinalização podem modular a expressão gênica, adesão, metabolismo, ciclo celular e morte (Choi & Ou, 2006; Ha et al., 2010; Camini et al., 2017).

Peterhans (1979) foi o primeiro a propor que um vírus poderia induzir estresse oxidativo aumentando os níveis de ERO. Em seguida, diversos estudos mostraram a importância do estresse oxidativo na progressão da patogênese causada por diversos agentes etiológicos virais. Alguns exemplos são 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; 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, 2013; Williams et al., 2014, Camini et al., 2017).

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, febril e convalescente, podendo funcionar como marcadores da evolução da doença (Gil et al., 2004; Klassen et al., 2004; Seet et al., 2009). Recentemente, Wang et al. (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 ERO contribui para o aparecimento do 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 (Peterhans, 1997a; Machida et al., 2006; Wang & Weinman, 2006; Abel et al., 2009; Darvesh & Bishayee, 2010; Pal et al., 2010; Ji-Hua et al., 2016).

O estresse oxidativo também tem papel importante na patogênese da inflamação pulmonar causada pelo RSV. A infecção de células epiteliais das vias aéreas induz a produção de ERO (Casola et al., 2001; Liu et al., 2004). Em células humanas epiteliais das vias aéreas, foi demonstrado que a infecção pelo RSV é capaz de aumentar os produtos de peroxidação lipídica e diminuir 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). Esses estudos mostram que o RSV é capaz de induzir dano oxidativo celular como resultado do desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes celulares.

Na infecção pelo HPV, o estresse oxidativo pode promover a transformação celular, o que pode facilitar a integração dos oncogenes do HPV ao DNA celular (Williams et al., 2011; Williams et al., 2014).

Humanos infectados com o HIV apresentam elevado grau de estresse oxidativo com alterações nas defesas antioxidantes, incluindo alterações no ácido ascórbico, carotenoides,

SOD e glutaciona. Assim, níveis séricos elevados de hidroperóxidos e malondialdeído contribuem para a progressão da doença (Dröge et al., 1994; Peterhans, 1997a; Coaccioli et al., 2010).

Nakatsue et al. (1998) demonstraram que a infecção pelo SINV ativa vias de sinalização através das proteínas cinases ativadas pelo estresse, como JNK e p38 MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos), sugerindo que a infecção viral induz respostas de estresse na célula hospedeira e que isso pode modificar a multiplicação 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 ERO 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. Esses trabalhos apresentaram evidências de que o estresse é um fator importante na patogênese do CHIKV.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou se a infecção de camundongos BALB/c pelo arbovírus *Caraparu virus* (CARV), membro da família *Peribunyaviridae*, poderia causar estresse oxidativo e alterar as defesas antioxidantes no fígado de animais infectados. Após a infecção subcutânea dos camundongos, o CARV foi detectado no fígado e a histopatologia revelou hepatite aguda. Elevados níveis séricos de aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT) e alta expressão hepática da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) foram encontrados nos animais infectados. A infecção pelo CARV não alterou os biomarcadores de estresse oxidativo, mas aumentou o conteúdo de glutaciona e alterou a expressão e atividade das enzimas SOD e CAT (Camini et al., 2014). Esse trabalho foi o primeiro a mostrar alterações na homeostase oxidativa após infecção por um *Orthobunyavirus* e ainda suscitou importantes questões, como por exemplo, se esse desbalanço entre o *status* oxidante/antioxidante poderia contribuir no progresso da infecção por outros importantes arbovírus, tal como o MAYV. Para o MAYV, não há estudos na literatura relacionando-o ao



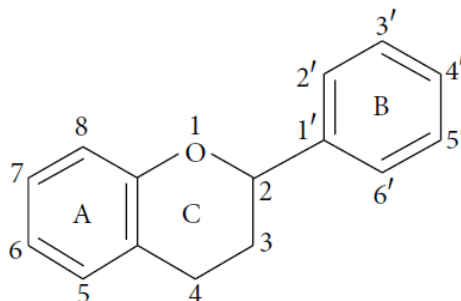
estresse oxidativo, mas uma hipótese é que, assim como para os outros *Alphavirus*, o estresse oxidativo esteja relacionado à patogênese desse vírus.

Conforme apresentado acima, vários trabalhos indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel importante nas doenças virais, desde a influência sobre o metabolismo das células hospedeiras até a influência direta sobre a patogênese do vírus. Portanto, estudos vêm sendo conduzidos no sentido de avaliar o uso de substâncias com potencial efeito antioxidante na terapia de doenças virais. Nesse sentido, compostos flavonoides estão sendo estudados devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais e antivirais, incluindo minociclina, quercetina, curcumina, melatonina, glutatona exógena, silimarina, entre outros.

## 2.7 – Flavonoides – Silimarina

O uso de medicamentos derivados de plantas é uma prática antiga e existem muitas substâncias capazes de gerar benefícios para a saúde, se utilizadas pela via correta e a quantidade adequada. Entre essas substâncias, existem diversos flavonoides com diferentes funções no organismo, como por exemplo, a silimarina.

Os flavonoides são um grande grupo de compostos polifenólicos que consistem de dois anéis benzeno (A e B, como mostrado na Figura 11) ligados por meio de um anel de pirano heterocíclico (C). Eles podem ser divididos em uma variedade de classes como flavonas (apigenina e luteolina), flavonóis (quercetina, kaempferol, miricetina e fisetina), flavanonas (hesperetina e naringenina) e outros. As várias classes de flavonoides diferem-se no nível de oxidação e do padrão de substituição do anel C, já os compostos individuais dentro de uma classe diferem-se no padrão de substituição dos anéis A e B (Middleton, 1998; Kumar & Pandey, 2013).



**Figura 11: Estrutura básica de um flavonoide.** Fonte: Kumar & Pandey, 2013.

Os flavonoides são substâncias fenólicas hidroxiladas que também atuam como um sistema de defesa antioxidante secundário em tecidos vegetais expostos a diferentes estresses abióticos e bióticos. A biodisponibilidade, o metabolismo e a atividade biológica dos flavonoides dependem de suas estruturas, do número total de grupos hidroxilas e da substituição de grupos funcionais (Kumar & Pandey, 2013).

Os grupos hidroxílicos funcionais medeiam seus efeitos antioxidantes por meio da eliminação de espécies reativas e/ou quelação iônica e/ou aumento ou proteção das defesas antioxidantes. Essas hidroxilas podem inibir as reações de oxidação por doarem átomos de hidrogênio às ERO, estabilizando-as. A quelação dos íons metálicos faz com que ocorra a inibição das reações de Fenton e Haber-Weiss, fontes endógenas de produção de ERO (Halliwell & Gutteridge, 1999; Kumar & Pandey, 2013; Mishra et al., 2013).

Entre os diversos flavonoides, a silimarina destaca-se por seu potente efeito antioxidante, anti-inflamatório e antifibrótico. A silimarina é o extrato da planta *Silybum marianum* (Figura 12). Pertencente à família das *Asteraceae* e possui cardo robusto, flor de cor arroxeada e folhas com nervuras de aspecto leitoso, o que confere o nome vulgar da planta “cardo de leite” (Capasso, 2003). *Silybum marianum* é nativa do sul da Europa, sul da Rússia, Ásia menor e norte da África e se adaptou ao norte e sul da América, bem como no sul da Austrália (Lino, 2012).



**Figura 12: Estrutura da planta *Silybum marianum*.** Fonte: Google, 2018.

O extrato dos frutos e sementes da *Silybum marianum* é constituído por 65-80% de silimarina e 20-35% de ácidos graxos. A silimarina extraída é um composto complexo que consiste de sete flavoligninas (silibina A, silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silicristina, isosilicristina e silidianina) e o flavonoide taxifolina. A silibina representa cerca de 60% do

extrato da silimarina, representando o principal componente ativo do extrato (Abenavoli et al., 2010; Polyak et al., 2013, Lani et al., 2015; Bijak, 2017).

A silimarina possui tempo de meia vida curto no organismo, menos que 4 horas, e sofre metabolismo de primeira passagem, o que torna necessário o consumo de altas doses ou de doses frequentes para que se obtenha o efeito desejado (Gatti & Perucca, 1994; Karimi et al., 2011). As propriedades antioxidantes e protetoras da silimarina podem ser atribuídas à sua capacidade de eliminar as ERO e aumentar os níveis intracelulares de glutathione, levando a uma inibição da degradação lipídica e, conseqüentemente, aumentando a estabilidade da membrana (Lani et al., 2015; Zakaryan et al., 2017).

Por suas ações, a silimarina tem sido amplamente utilizada em diferentes distúrbios do fígado e da vesícula biliar, particularmente doenças hepáticas crônicas, cirrose e carcinoma hepatocelular (Carini et al., 1992; Wellington & Jarvis, 2001; Crocenzi e Roma, 2006; Sangeetha et al., 2010; Mastron et al., 2015; Chien-Yun et al., 2015; Federico et al., 2017; Liang et al., 2017).

Além disso, já foi demonstrada atividade antiviral da silimarina contra o HBV, HCV e CHIKV (Wagoner et al., 2010; Lino, 2012; Lani et al., 2015; Liu et al., 2016; Federico et al., 2017; Huang et al., 2017; Liang et al., 2017). Em especial, o trabalho de Lani et al (2015) avaliou a atividade antiviral dos flavonoides quercetina, kaemperol e silimarina contra a replicação *in vitro* (células Vero) do CHIKV, um vírus estreitamente relacionado ao MAYV. E, por meio de diferentes experimentos, os autores mostraram que somente a silimarina apresentou atividade antiviral significativa contra o CHIKV.

Portanto, considerando que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese de vários vírus e que o uso de substâncias antioxidantes moduladoras tem efeito promissor no tratamento das doenças virais, esse trabalho teve como objetivo avaliar se o MAYV seria capaz de causar estresse oxidativo *in vitro*, e se a silimarina poderia apresentar ação antiviral contra o MAYV e restaurar o equilíbrio redox celular após a infecção. Acreditamos que, elucidar os mecanismos da infecção pelo MAYV e ampliar os conhecimentos sobre os aspectos relacionados à sua patogênese são de primordial importância, visto que a febre Mayaro é um problema de saúde pública e de caráter emergente.

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1 - Objetivo Geral

Avaliar, em células HepG2, o estresse oxidativo e defesas antioxidantes após infecção pelo MAYV e o efeito antiviral e antioxidante da silimarina.

#### 3.2 - Objetivos Específicos

1 – Caracterizar a infecção de células HepG2 pelo MAYV por meio da determinação da cinética de crescimento, viabilidade celular e efeito citopático;

2 - Em células HepG2 controles ou infectadas pelo MAYV, em diferentes tempos, avaliar:

2.1- O *status* oxidante por meio das dosagens de:

2.1.1- Espécies reativas de oxigênio;

2.1.2- Malondialdeído;

2.1.3- Proteína carbonilada;

2.2- O *status* antioxidante por meio das dosagens de:

2.2.1- Glutaciona total e a relação GSH/GSSG;

2.2.2- Atividade total das enzimas SOD e CAT;

2.2.3- Expressão do mRNA das enzimas SOD1 e CAT;

2.2.4- Expressão proteica das enzimas SOD1 e CAT;

3 - Em células Vero e HepG2 avaliar se a silimarina apresenta atividade anti-MAYV:

3.1- Determinar a concentração máxima não citotóxica da silimarina, analisando a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>);

3.2- Avaliar a atividade antiviral global, determinar a dose protetiva para 50% das células infectadas (CE<sub>50</sub>) e o Índice de Seletividade (IS);

3.3- Avaliar a atividade antiviral pelo Ensaio de Redução de Placa;

4 - Em células HepG2, avaliar se a silimarina é capaz de restabelecer o equilíbrio redox após a infecção pelo MAYV, por meio das dosagens de:

4.1- Espécies reativas de oxigênio;

4.2- Malondialdeído;

4.3- Proteína carbonilada.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Células e vírus

Células de rim de macaco verde africano (Vero) e de carcinoma hepático humano (HepG2) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA). Essas células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, com DMEM (Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco, Cultilab, Brasil) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, *Cultilab*, Brasil), penicilina/estreptomicina (200U/mL, *Sigma-Aldrich*, EUA) e fungizona (2,5µg/mL, *Sigma-Aldrich*, EUA).

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 (182cm<sup>2</sup>) contendo monocamada de células Vero que foram incubadas até o efeito citopático (ECP) atingir cerca de 90%. O sobrenadante da infecção celular foi clarificado, aliquotado em microtubos e armazenados 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 200µL de diluições seriadas do MAYV feitas em DMEM 0% SFB, deixando um poço como controle de células, no qual foram adicionados 200µL de DMEM 0% SFB. Após 1h de adsorção, com homogeneização constante, o meio foi removido e a cada poço foram adicionados 2mL 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 – Silimarina

A silimarina foi adquirida comercialmente (*Sigma-Aldrich*, EUA) e uma solução estoque foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma-Aldrich*, EUA), na concentração de 2,5 mg/mL, e armazenada a -20°C. Para a realização dos experimentos, a solução estoque foi diluída com DMEM e filtrada com filtro de seringa 0,2 µm (*Millipore*, EUA) no momento do uso. A concentração do DMSO em soluções de trabalho preparadas com DMEM foi mantida em 0,1%.

### 4.4 – Cinética de crescimento do MAYV e ensaio de viabilidade celular

Células HepG2 foram implantadas em placas de 6 poços e 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 10% SFB. Nos tempos de 6, 15 e 24 horas após a infecção (hpi), alíquotas dos sobrenadantes das células foram coletadas. Posteriormente, essas alíquotas foram tituladas em células Vero, conforme o item 4.2, e com os resultados obtidos foi traçada uma curva da cinética de crescimento do MAYV. O efeito citopático (ECP) das células infectadas foi observado por microscopia ótica (100x) e comparado às células não infectadas. Ainda, a viabilidade das células pós-infecção foi analisada pela avaliação da morfologia celular e pela coloração com 0,4% de Azul de Tripán, nos tempos de 6, 15 e 24 hpi.

### 4.5 - Dosagem de ERO

A produção de ERO intracelular foi mensurada utilizando-se o Kit *Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species* (*Invitrogen*, EUA). A técnica utiliza um marcador fluorogênico (5-ou-6)-carboxy-2',7' dichlorodihydro fluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA), que quando quebrado por esterases intracelulares não específicas gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as ERO, preferencialmente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tornando-se fluorescente.

O ensaio foi realizado em placa branca de 96 poços, na qual 2,5x10<sup>4</sup> células HepG2 foram adicionadas em cada cavidade. A dosagem foi realizada conforme recomendado pelo fabricante. As células foram infectadas com o MAYV (moi de 5), e após 1, 2, 4, 6, 15 e 24 hpi

(8 amostras controles e 8 infectadas/tempo), foram lavadas com tampão de Solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS) e carregadas com 25  $\mu\text{M}$  de carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  durante 30 minutos a 37°C, protegido da luz (incluindo o controle positivo - hidropéroxido *tert*-butil (TBHP) - um indutor da produção de ERO). Após esse tempo, as células foram lavadas três vezes e foram feitas leituras da intensidade de fluorescência a 485/535nm (excitação/emissão). O aparelho utilizado foi o leitor de microplacas tipo VICTOR™ X3 Multilabel, com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5.

#### 4.6 - Dosagem de Malondialdeído

Os níveis de Malondialdeído, biomarcador de peroxidação lipídica, foram mensurados utilizando-se um protocolo padrão adaptado de Costa, (2014).

Células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas (moi de 5) ou não. Nos tempos de 6, 15 e 24 hpi (8 amostras controles e 8 infectadas por tempo), as células foram lavadas com PBS, raspadas e lisadas. Os lisados celulares foram combinados com 8,1% de SDS, 2,5M de ácido acético e 0,8% de ácido tiobarbitúrico. A mistura foi aquecida a 95°C durante 1 h e 30 min, e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos como a concentração de MDA participando na reação (nmol/mL).

#### 4.7 – Dosagem de Proteína carbonilada

Os níveis de proteína carbonilada foram determinados de acordo com o método descrito por Levine et al (1994). As células HepG2 foram semeadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço), e infectadas ou não com o MAYV (moi de 5), contendo 8 amostras controles e 8 infectadas por tempo. Após 6, 15 e 24 h, o conteúdo de proteína carbonilada foi medido pela derivatização da proteína carbonilada com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), o que resultou na geração do produto dinitrofenil hidrazona (DNP). A absorbância das amostras foi determinada a 370 nm em espectrofotômetro. A concentração das proteínas derivatizadas com DNPH foi calculada utilizando um coeficiente de absorção molar de  $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado/mg de proteína. O teor de

proteína total foi determinado de acordo com o método descrito por Bradford utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão.

#### **4.8 - Determinação do conteúdo de glutathiona total e da razão GSH/GSSG**

O conteúdo de glutathiona total e a relação GSH/GSSG foram determinados em células hepáticas utilizando o método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico], DTNB – GSSG proposto por Griffith (1980). Este ensaio utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412nm.

Para o ensaio, células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas (moi de 5) ou não. Nos tempos de 6, 15 e 24 hpi (8 amostras controles e 8 infectadas por tempo), as células foram lavadas com PBS, raspadas e lisadas. A dosagem foi realizada de acordo com o protocolo padrão e as absorbâncias foram lidas em um leitor de placas ELISA a 412 nm. O conteúdo de glutathiona foi expresso em nmol/mL. Para a medição de GSSG, 2-vinilpiridina foi adicionada à amostra e em seguida as absorbâncias foram lidas no mesmo leitor de placas. A concentração de glutathiona reduzida foi obtida subtraindo-se a concentração total da glutathiona oxidada.

#### **4.9 – Dosagem da atividade total das enzimas SOD e CAT**

As atividades enzimáticas de SOD e CAT foram analisadas através de ensaios bioquímicos utilizando kits específicos.

Em ambas as dosagens, as células HepG2 foram semeadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas ou não com o MAYV a uma moi de 5 (8 amostras controles e 8 infectadas por tempo). Nos tempos de 6, 15 e 24 hpi, as células foram lavadas, raspadas, lisadas e armazenadas no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para aguardar a realização da dosagem, de acordo com as recomendações do fabricante. As atividades de SOD e CAT foram expressas como U/mL.

Para a dosagem de SOD foi utilizado o kit *Superoxide Dismutase Assay* (Cayman Chemical Company, EUA), o qual apresenta um sistema de geração de ânions superóxido, xantina e xantina oxidase. Esse kit avalia a capacidade da solução teste de inibir a reação do



ânion superóxido com o WST (2-(4 iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio). A reação quando ocorrida forma um composto denominado formazan, o qual absorve luz a 450nm.

O kit utilizado para a dosagem de CAT foi o ECAT-100 (*BioAssay Systems*, USA), o qual apresenta um sistema que mede diretamente a degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando um corante redox. A alteração na intensidade de cor é diretamente proporcional à atividade da Catalase na amostra.

#### 4.10 – Expressão do RNAm de SOD1, CAT e GAPDH

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

Células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços (1x10<sup>6</sup> células/poço) e infectadas com o MAYV em uma moi de 5. Nos tempos de 6, 15 e 24 hpi (8 amostras controles e infectadas/tempo) 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*, Brasil), 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, 2µg do RNA total foram usados como molde e as reações feitas para um volume final de 20µL, utilizando-se a enzima *MultiScribe™* (50U/µL) e oligos randômicos (*GeneAmpR RNA PCR*, *Applied Biosystems*, EUA), nas concentrações indicadas pelo fabricante.

##### 4.10.2- PCR em tempo real (qRT-PCR)

O nível de expressão do mRNA de SOD1, CAT 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, 15seg e 60°C 1min, 40 vezes. O aparelho *ABI 7500 Real Time PCR Instrument* (*Applied Biosystems*, EUA) foi utilizado e os valores de ΔCt foram corrigidos pelo valor do gene normalizador GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). O valor 2<sup>-ΔΔCt</sup> de cada amostra foi calculado e utilizado para expressão dos resultados.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores são mostradas abaixo (Tabela III) e foram desenhadas com base nas sequências de nucleotídeos para humanos, disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As construções foram feitas com o auxílio do programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

**Tabela III.** 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>	GAAGGTGTGGGAAGCATT	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC	174 pb	NW_004078109.1
<b>CAT</b>	GGAGATTCAACTGCCAATG	TCTGTTCTCATTTCAGCACG	78	NG_013339.1
<b>GAPDH</b>	TGGGTGTGAACCATGAGAAG	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG	125	NG_007073.2

#### 4.11 – Análise da expressão proteica de SOD e CAT

##### 4.11.1- Extração das proteínas totais celulares

Para o ensaio de Western Blot as células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas numa moi de 5 (8 amostras controles e infectadas/tempo). Nos tempos de 6, 15 e 24 hpi, os sobrenadantes das placas foram descartados, os poços lavados com PBS 1x e então foi adicionado em cada poço 1mL do tampão de lise (100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1% de Triton X-100, 0.2 mM de EDTA, 20% de glicerol v/v, 200 mM de NaCl, 1 mM de NaVO<sub>3</sub>, 1 mM de PMSF, 5 µg/ml de aprotinina, 2.5 µg/ml de leupeptina, 50mM de NaF e 1 mM de DTT). Após a lise, o sobrenadante foi clarificado, aliqotado e armazenado no freezer -80°C até o momento do uso.

##### 4.11.2- Western Blot

Após a determinação da concentração de proteínas em cada amostra pelo método de Bradford, 10µg de proteínas foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose, usando o *Mini Trans-Blot Eletrophoretic Tranfer Cell* (Bio-Rad, Brasil). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado e incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários diluídos em PBS 1x contendo 5% (p/v) de BSA e 0,1% de Tween-20.

Os anticorpos primários utilizados foram anti-SOD1 policlonal de coelho diluído 1:1000 (Catálogo número sc 11-407, *Santa Cruz Biotechnology*, EUA) e anti-CAT monoclonal de coelho diluído 1:1000 (Catálogo número ab-76110, *ABCAM*, EUA). Após incubação *overnight* com o anticorpo primário, as membranas foram novamente incubadas por 1h com o anticorpo secundário bovino anti-coelho conjugado à peroxidase (Catálogo número sc-2370, *Santa Cruz Biotechnology*, EUA), na diluição de 1:3000. Em seguida, as membranas foram então reveladas com as soluções do kit *ECL-Plus*, como descrito nas instruções dos fabricantes (Catálogo número W1015, *Promega*, USA). Após o tempo de exposição contra o filme de raio-X (*Kodak*, EUA) as membranas foram reveladas utilizando-se revelador e fixador (*Kodak*, EUA).

Após a detecção das bandas esperadas, as membranas foram bloqueadas novamente por 1h e incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo monoclonal de camundongo anti- $\beta$ -actina diluído 1:2000 (Catálogo número A1978, *Sigma-Aldrich*, EUA). Após incubação *overnight*, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário de camundongo conjugado a peroxidase, diluído 1:5000 (Catálogo número A4416, *Sigma-Aldrich*, EUA) e, seguindo o descrito acima, as membranas foram reveladas. A análise densitométrica da intensidade das bandas do Western blot foi realizada usando o *System Alpha Innotech by Alpha View Analyse software* V.3.0.0.0.

#### **4.12 - Ensaio de citotoxicidade**

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) foi realizado para avaliar a citotoxicidade da silimarina em células Vero e HepG2. Foram feitos dois experimentos em cada tipo celular, apresentando em cada experimento 8 controles de células, 8 controles negativos (meio contendo 0,1% de DMSO) e 5 amostras de cada concentração de silimarina.

Cada tipo celular foi implantado em diferentes placas de 96 poços, numa densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço. No dia seguinte foram tratadas com diferentes concentrações de silimarina (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125  $\mu\text{g/mL}$ ). As placas foram então incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Dois dias depois, adicionou-se o MTT e após 2h foram feitas as leituras das absorbâncias a 495 nm no leitor de microplacas tipo VICTOR™ X3 Multilabel. A concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) foi definida como a concentração do composto que

reduziu 50% da viabilidade celular em comparação às células controles. Os valores de  $CC_{50}$  foram obtidos a partir da análise da regressão linear da curva de concentração/citotoxicidade, obtida utilizando-se os valores encontrados pela equação:

$$CC_{50} = \frac{(\text{células tratadas} \times 100)}{\text{células não tratadas}}$$

#### 4.13 – Ensaios antivirais

##### 4.13.1 – Ensaio da atividade antiviral global pelo MTT

O ensaio primário para se avaliar o efeito antiviral foi o ensaio de MTT. Foram feitos dois experimentos em cada tipo celular, apresentando em cada experimento 8 controles de células, 8 controles de vírus (moi de 5) e 5 amostras de cada concentração de silimarina infectadas com o MAYV numa moi de 5.

Células Vero e HepG2 foram semeadas em diferentes placas de 96 poços numa densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas as células foram tratadas com diferentes concentrações de silimarina (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125  $\mu\text{g/mL}$ ) e infectadas com o MAYV. As placas foram então incubadas a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas. Após dois dias, as placas foram observadas sob o microscópio e avaliou-se o grau de efeito citopático como medida da inibição da replicação do vírus e então foi realizado o MTT para confirmar os resultados observados pelo ECP. As leituras das absorbâncias foram feitas a 495 nm no leitor de microplacas tipo VICTOR™ X3 Multilabel.

A concentração efetiva/protetiva para 50% das células infectadas ( $CE_{50}$ ), ou seja, a concentração eficaz com 50% de efeito antiviral foi expressa como a concentração que promoveu a proteção de 50% das células infectadas, calculada por meio da equação:

$$CE_{50} = \frac{(A-B)}{C-B} \times 100$$

Em que **A**: Células tratadas e infectadas; **B**: Controle de vírus; **C**: Controle de células.

Foi calculado também o Índice de Seletividade (IS) da silimarina. O IS é um parâmetro importante na avaliação da atividade antiviral de uma substância, pois fornece a relação entre os efeitos farmacológicos/doses efetivas e citotóxicos dos compostos em estudo. O IS expressa a razão entre a  $CC_{50}$  e a  $CE_{50}$ . Portanto, o IS foi calculado conforme a equação:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CE_{50}}$$

Foi feito também um ensaio em placa de 6 poços para avaliar o efeito citopático do MAYV em células HepG2 tratadas (25 µg/mL) ou não com a silimarina.

#### **4.13.2 – Ensaio de Redução de Placa**

A atividade da silimarina anti-MAYV também foi testada pelo Ensaio de Redução de Placa. Para tal, células Vero e HepG2 foram implantadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço). No dia seguinte, as células foram infectadas com moi de 0,01 do MAYV e nos poços controles foi adicionado meio 0%. Após 1h de adsorção, as células foram lavadas com PBS e então a silimarina (100 µg/mL-Vero e 25 µg/mL-HepG2) juntamente com o meio contendo CMC 2% SFB foram adicionados aos respectivos poços, nos controles foi adicionado apenas o meio contendo CMC 2% SFB, seguido por dois dias de incubação para as células Vero e 5 dias para as células HepG2. Após esse tempo, as placas foram fixadas com formol, coradas com cristal violeta e então foi realizada a contagem das UFP.

#### **4.14 – Efeito da silimarina nos parâmetros de estresse oxidativo**

Para avaliar se a silimarina seria capaz de alterar o estresse oxidativo em células infectadas com o MAYV, analisou-se a produção de ERO e os biomarcadores de estresse, MDA e proteína carbonilada. Células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas com o MAYV numa moi de 5. Após a adsorção, a silimarina foi adicionada aos respectivos poços (25µg/mL) e nos tempos de 6, 15 e 24 hpi (8 amostras controles e 8 infectadas por tempo), foram feitas as dosagens de ERO, MDA e proteína carbonilada, conforme os tópicos 4.5, 4.6 e 4.7, respectivamente.

#### **4.15 – Análise Estatística**

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism, versão 5.01 e expressos como média  $\pm$  Desvio Padrão (DP). O teste t-student com 95% de confiança foi utilizado para determinar o nível de diferença entre as células infectadas e controles, onde \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$ . As letras a, b e c representam diferenças entre grupos, usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey.

## 5 - RESULTADOS

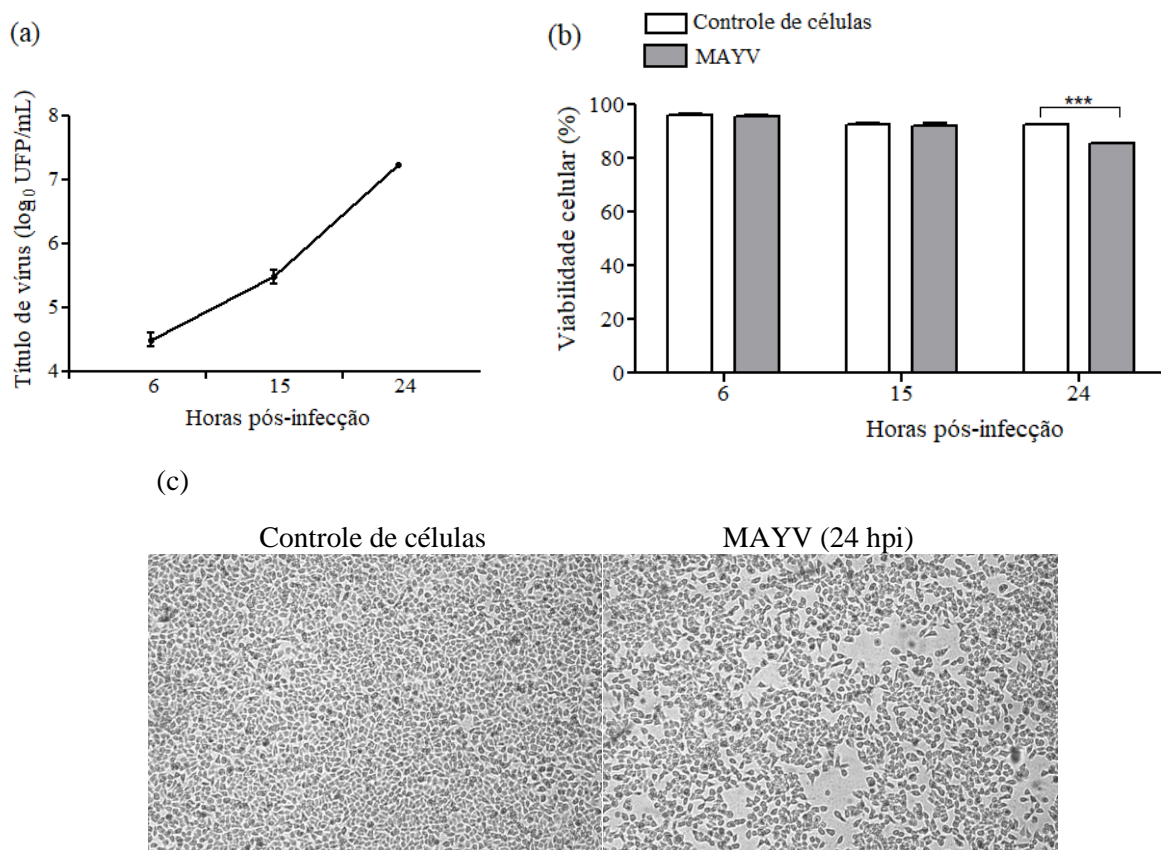
### 5.1 - Caracterização da infecção de células HepG2 pelo MAYV - cinética de crescimento, viabilidade celular e efeito citopático

Para obtenção dos estoques virais (amostras *pool* semente e 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 células HepG2, objeto de estudo deste trabalho, também são suscetíveis e permissivas à multiplicação do MAYV. Para tal, essas células foram infectadas e em diferentes hpi os sobrenadantes foram coletados e titulados em células Vero. Com os resultados foi traçada uma curva da cinética de crescimento viral.

Partículas infecciosas do MAYV foram detectadas no sobrenadante das células HepG2 nos diferentes tempos analisados, com títulos médios de  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^7$  UFP/mL, nos tempos 6, 15 e 24h, respectivamente (Figura 13a). Logo, esse aumento exponencial observado na quantidade de vírus indica uma efetiva multiplicação e produção da progênie viral. Não foram observadas diferenças na viabilidade das células infectadas nos tempos iniciais pós-infecção (6 e 15h), quando comparado às células controles; no entanto, a partir do tempo de 24h, uma perda da viabilidade celular nas células infectadas foi notada, com uma diminuição de cerca de 7% (Figura 13b). O efeito citopático do MAYV 24h após a infecção de células HepG2 foi caracterizado pela presença de células arredondadas e refringentes, que se destacam da monocamada, formando placas de lise (Figura 13c).

Portanto, esses resultados nos mostram que células HepG2 são suscetíveis e permissivas à infecção pelo MAYV, sendo o vírus capaz de multiplicar de forma eficiente, alcançando altos títulos. Todos os demais experimentos foram feitos numa *moi* de 5 a fim de garantir que um maior número de células fosse infectado ao mesmo tempo. Além disso, como verificamos que a partir de 24h a viabilidade celular começa a diminuir nas células infectadas, os experimentos seguintes foram avaliados até esse tempo.



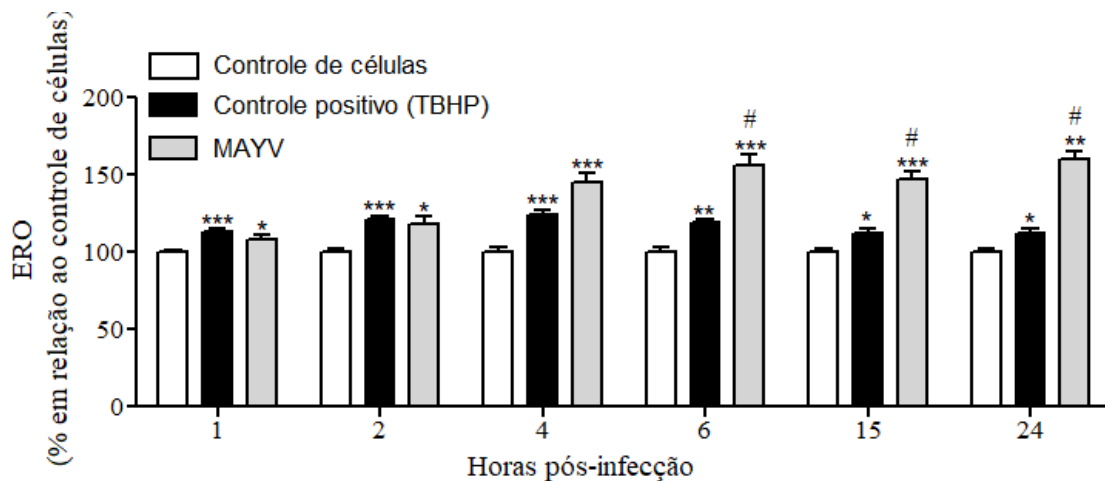
**Figura 13: Caracterização da infecção de células HepG2 pelo MAYV.** (a) Cinética de crescimento do MAYV em células HepG2. As células foram infectadas com o MAYV (moi de 5). Alíquotas do sobrenadante foram coletadas e os títulos virais determinados em células Vero por meio da titulação por contagem das UFP. Os títulos foram expressos como log<sub>10</sub> UFP/mL. (b) Viabilidade das células HepG2 infectadas ou não com MAYV. A viabilidade das células foi analisada pela avaliação da morfologia celular e pela coloração com 0,4% de Azul de Tripán. (c) Fotos ilustrativas de microscopia ótica de células HepG2 controles e infectadas com o MAYV, 24 hpi. Aumento de 100x. Os resultados de (a) e (b) incluem dados de dois experimentos (média ± DP, n=16). \*\*\* $p \leq 0,001$  em comparação às células controles, teste t-student.

## 5.2 – Avaliação do *status* oxidante em células HepG2 infectadas ou não pelo MAYV

### 5.2.1 – Espécies Reativas de Oxigênio

Para determinar se a infecção pelo MAYV foi capaz de induzir a formação de ERO em células HepG2, avaliou-se a produção dessas espécies em células infectadas ou não, em diferentes tempos. A Figura 14 mostra que, em todos os tempos analisados, nas células infectadas com o MAYV houve uma maior produção de ERO, em relação às células

controles. Ainda, nos tempos de 6, 15 e 24 hpi, a indução de ERO pelo MAYV foi maior que a indução pelo controle positivo hidroperóxido *tert*-butil (TBHP).



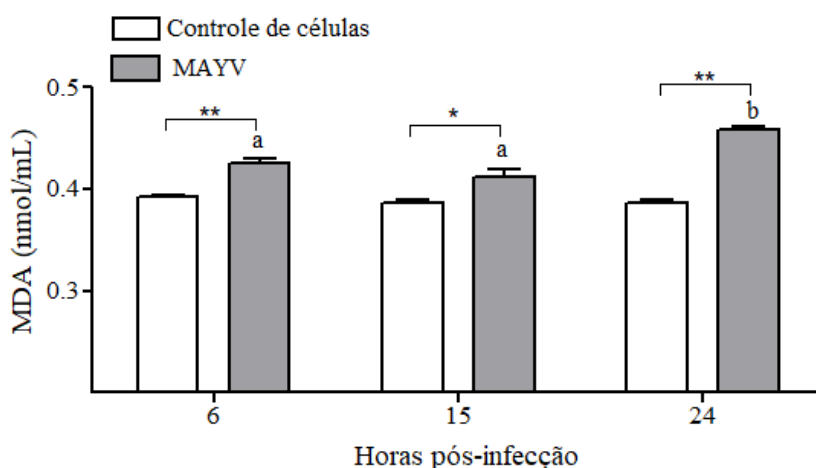
**Figura 14: MAYV induz a formação de ERO em células HepG2.** Células HepG2 foram infectadas com MAYV numa moí de 5 e em vários tempos pós-infecção carregadas com 25  $\mu$ M da sonda carboxi- $H_2$ DCFDA. A quantidade de ERO produzida foi mostrada como % de intensidade média de fluorescência em relação às células controles. Os resultados incluem dados de três experimentos (média  $\pm$  DP,  $n=24$ ). TBHP: hidroperóxido *tert*-butil, indutor de ERO. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  e \*\*\* $p \leq 0,001$  em comparação às células controles, teste t-student. # indica diferenças entre as células infectadas com MAYV e as células tratadas com controle positivo TBHP, com  $p \leq 0,05$  pelo teste t-student.

### 5.2.2 – Malondialdeído

Uma vez que a infecção de células HepG2 com o MAYV foi capaz de induzir uma maior produção de ERO, o próximo passo foi avaliar se esse evento poderia culminar com o estresse oxidativo celular. Para tal, primeiramente foi avaliado o biomarcador de peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA), nas células controles e infectadas, nos tempos de 6, 15 e 24 hpi.

Como observado na Figura 15, a infecção de células HepG2 com o MAYV resultou em um aumento nos níveis de MDA, em todos os tempos analisados. Ainda, no tempo de 24h, o aumento nos níveis de MDA nas células infectadas foi maior que nos tempos de 6 e 15h.





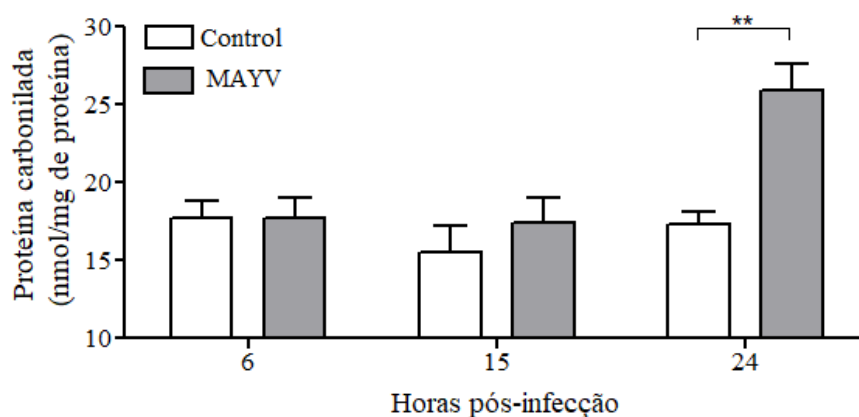
**Figura 15:** A infecção pelo MAYV induz aumento nos níveis de MDA em células HepG2. Células HepG2 foram infectadas com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi foram feitas as dosagens de MDA. Os resultados incluem dados de dois experimentos (média  $\pm$  DP,  $n=16$ ), onde  $*p \leq 0,05$  e  $**p \leq 0,01$  em comparação às células controles (teste t-student). Letras diferentes indicam diferenças entre os níveis de MDA em células infectadas, usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey.

### 5.2.3 – Proteína carbonilada

Para corroborar o resultado de MDA e assim mostrar que o estresse oxidativo é induzido após a infecção pelo MAYV, avaliamos outro biomarcador desse evento, a proteína carbonilada, que é um indicador de oxidação de proteínas.

Embora nenhuma alteração tenha sido observada nos níveis de proteína carbonilada nas células infectadas com o MAYV nos tempos iniciais pós-infecção (6 e 15h), observamos um aumento desse marcador nas células infectadas no tempo de 24h (Figura 16).

Assim, a partir dos dados mostrados até aqui, podemos inferir que a infecção pelo MAYV em células HepG2 é capaz de culminar com maior produção de ERO e consequente estresse oxidativo.



**Figura 16: A infecção pelo MAYV induz aumento nos níveis de proteína carbonilada em células HepG2.** Células HepG2 foram infectadas com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi foram feitas as dosagens de proteína carbonilada. Os resultados incluem dados de dois experimentos (média  $\pm$  DP,  $n=16$ ), onde  $**p \leq 0,01$  em comparação às células controles (teste t-student).

### 5.3 – Avaliação do *status* antioxidante em células HepG2 infectadas pelo MAYV

Desde que nós observamos que o MAYV induz um aumento na produção de ERO e causa estresse oxidativo em células HepG2, nosso próximo objetivo foi averiguar se a infecção poderia modificar também as defesas antioxidantes celulares. Para tal, em células HepG2 infectadas ou não, avaliamos o conteúdo de glutathiona total e a relação GSH/GSSG; a atividade, expressão gênica e proteica das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Os resultados obtidos são mostrados abaixo.

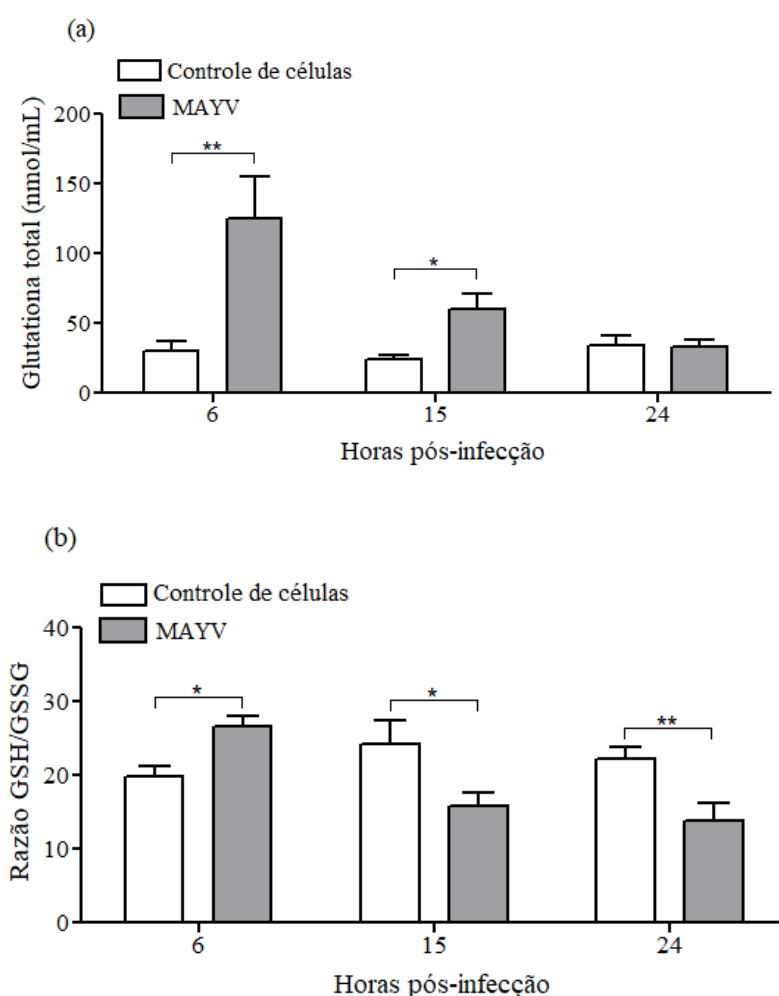
#### 5.3.1 – Glutathiona total e relação GSH/GSSG

Resumidamente, o sistema glutathiona é responsável por inativar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A glutathiona está presente nas células principalmente em sua forma reduzida (GSH), que representa aproximadamente 90% do total, a quantidade restante está na forma de glutathiona oxidada (GSSG). A razão GSH/GSSG pode ser usada como um indicador indireto de estresse oxidativo, pois, uma diminuição da razão GSH/GSSG pode indicar que mais  $H_2O_2$  foi produzido no meio intracelular e que mais GSH está sendo oxidada em GSSG a fim de detoxificar essa ERO.

Primeiramente, avaliamos se a infecção de células HepG2 pelo MAYV poderia alterar o conteúdo celular total de glutathiona. Conforme mostrado na Figura 17a, o conteúdo de

glutaciona total apresentou-se aumentado nas células infectadas pelo MAYV nos tempos de 6 e 15h, em comparação às células controles. No entanto, após 24h, os níveis de glutaciona total nas células infectadas se igualaram aos das células controles.

Observando a razão GSH/GSSG na Figura 17b e comparando com os níveis de glutaciona total da Figura 17a, podemos inferir que no tempo de 6 hpi essa razão aumentou nas células infectadas provavelmente devido a um aumento nos níveis de GSH. Por outro lado, foi observada uma diminuição progressiva na razão GSH/GSSG em células infectadas com o MAYV nos tempos de 15 e 24h, mostrando que, com o decorrer da infecção houve um aumento no conteúdo da GSSG nas células infectadas.

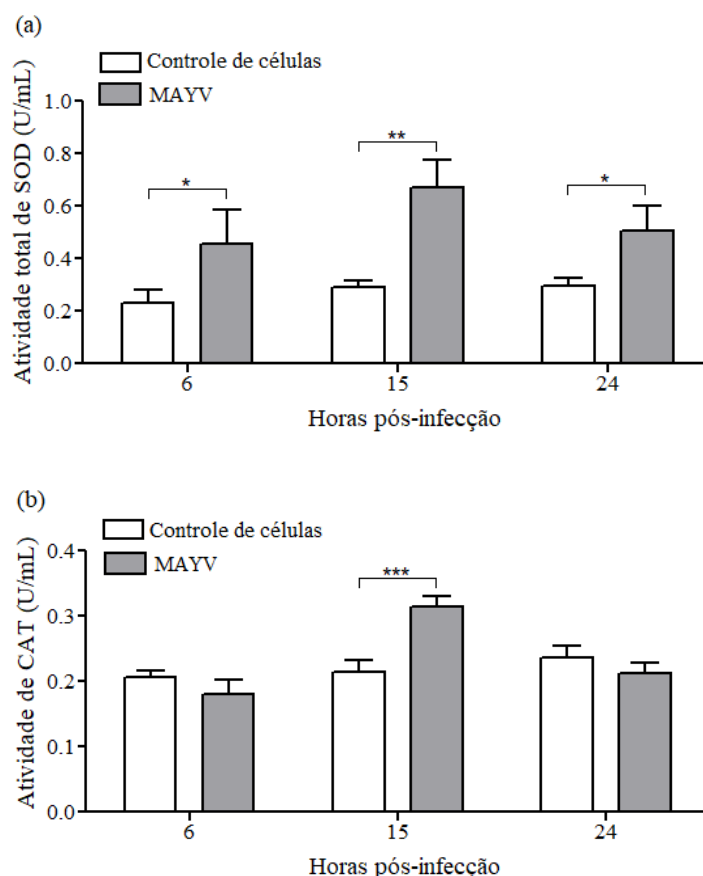


**Figura 17: MAYV altera conteúdo de glutaciona total e da razão GSH/GSSG em células HepG2.** (a) As células foram infectadas com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi foi feita a dosagem de glutaciona total. (b) Níveis de GSSG foram determinados e a relação GSH/GSSG estabelecida. Os resultados incluem dados de dois experimentos (média  $\pm$  DP,  $n=16$ ), onde  $*p \leq 0,05$  e  $**p \leq 0,01$  em comparação às células controles (teste t-student).

### 5.3.2 – Atividade de SOD e CAT

O próximo objetivo do trabalho foi avaliar se o MAYV poderia alterar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em células HepG2. Resumidamente, as SOD são a primeira e mais importante linha do sistema de defesa enzimático, pois protegem os alvos celulares do ataque do ânion superóxido. Como resultado da dismutação do ânion superóxido, ocorre produção de peróxido de hidrogênio, e a CAT, por sua vez, o converte à água e oxigênio molecular.

Como pode ser observado na Figura 18a, nos diferentes tempos analisados, houve um aumento significativo na atividade total de SOD nas células infectadas em relação às células controles. Com relação à atividade de CAT, nenhuma diferença foi observada entre as células infectadas e controles nos tempos de 6 e 24h. Entretanto, um aumento na atividade dessa enzima foi observado 15h após infecção pelo MAYV (Figura 18b).

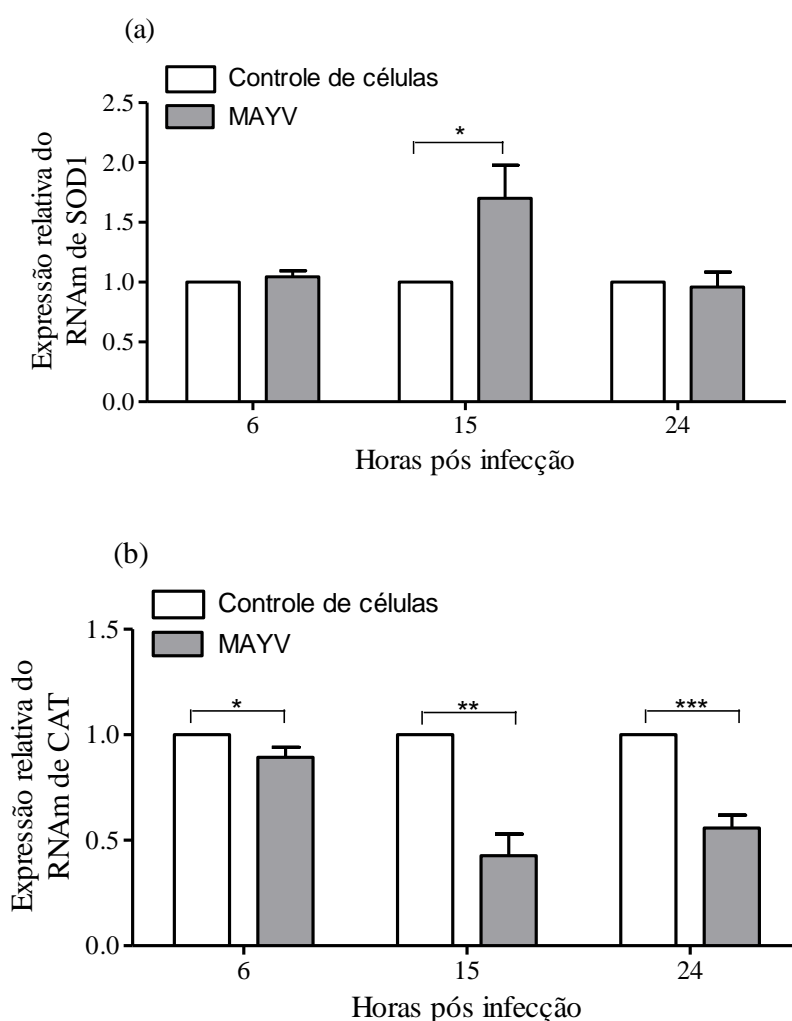


**Figura 18: MAYV altera as atividades das enzimas SOD e CAT em células HepG2.** As células foram infectadas com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi foi feita a dosagem da atividade total de SOD (a) e da atividade da CAT (b). Os resultados incluem dados de dois experimentos (média  $\pm$  DP,  $n=16$ ), onde \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$  e \*\*\* $p \leq 0,001$  em comparação às células controles (teste t-Student).

### 5.3.3 – Expressão gênica de SOD1 e CAT

Uma vez que a infecção pelo MAYV alterou as atividades das enzimas SOD e CAT, nosso próximo passo foi verificar se essas alterações observadas poderiam ter ocorrido devido a modificações na expressão dos RNAm dessas enzimas. Assim, avaliamos por qRT-PCR a expressão do RNAm das enzimas SOD1 (isoforma citoplasmática e mais abundante) e CAT.

A Figura 19a mostra que houve um aumento na expressão do RNAm de SOD1 nas células infectadas com o MAYV no tempo de 15 hpi. Por outro lado, a infecção diminuiu a expressão do RNAm de CAT em todos os tempos analisados (Figura 19b).



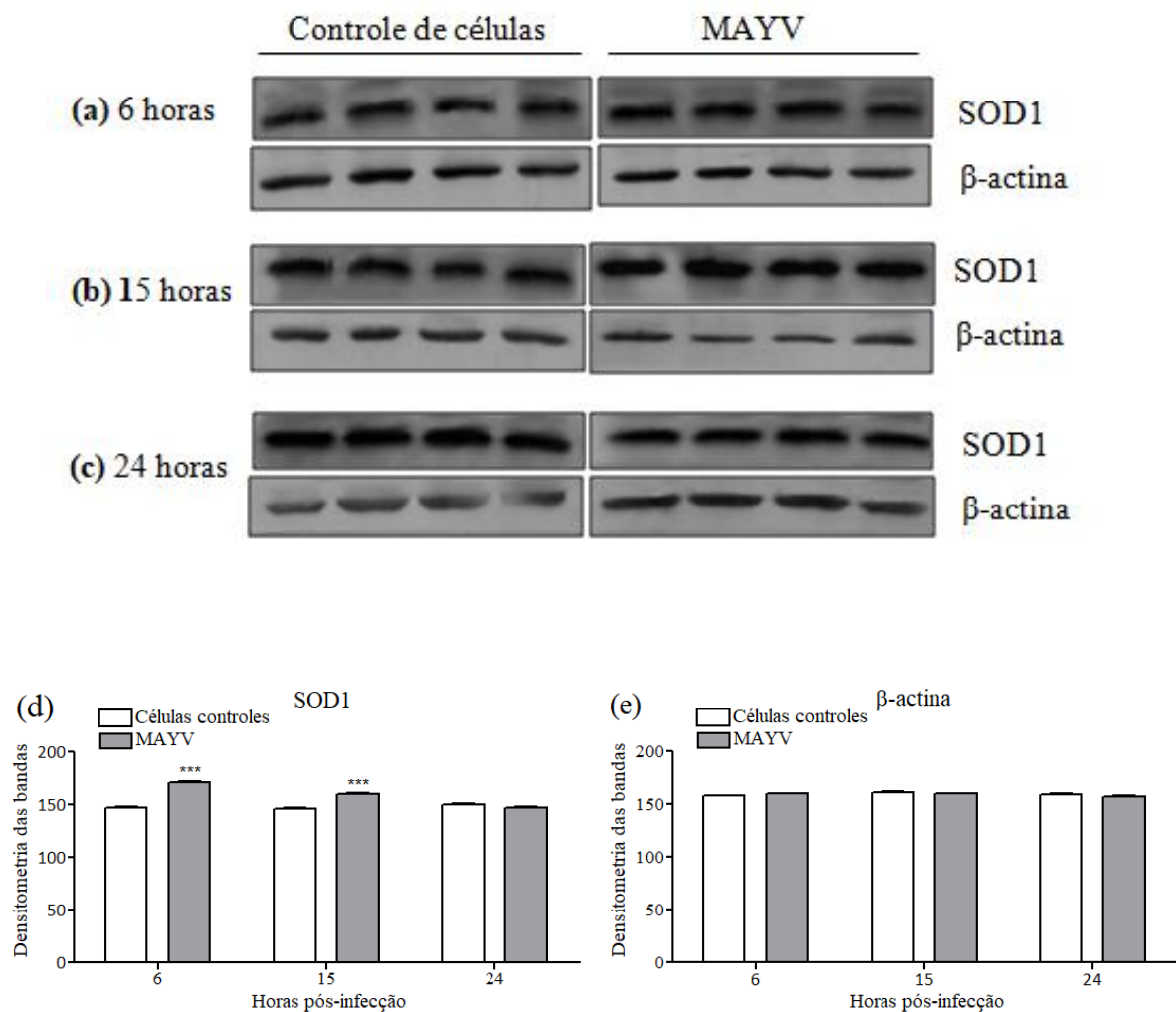
**Figura 19: MAYV altera a expressão do RNAm de SOD1 e CAT em células HepG2.** As células foram infectadas com o MAYV (moi de 5) e 6, 15 e 24 hpi o RNA total foi extraído. A expressão dos RNAm foi avaliada por qRT-PCR e os valores normalizados pela expressão de GAPDH. (a) Expressão relativa de RNAm de SOD1. (b) Expressão relativa de RNAm de CAT. Resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 9$  por grupo), onde  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$  e  $***p \leq 0,001$  em comparação às células controles (teste t-Student).

### 5.3.4 – Expressão proteica de SOD1 e CAT

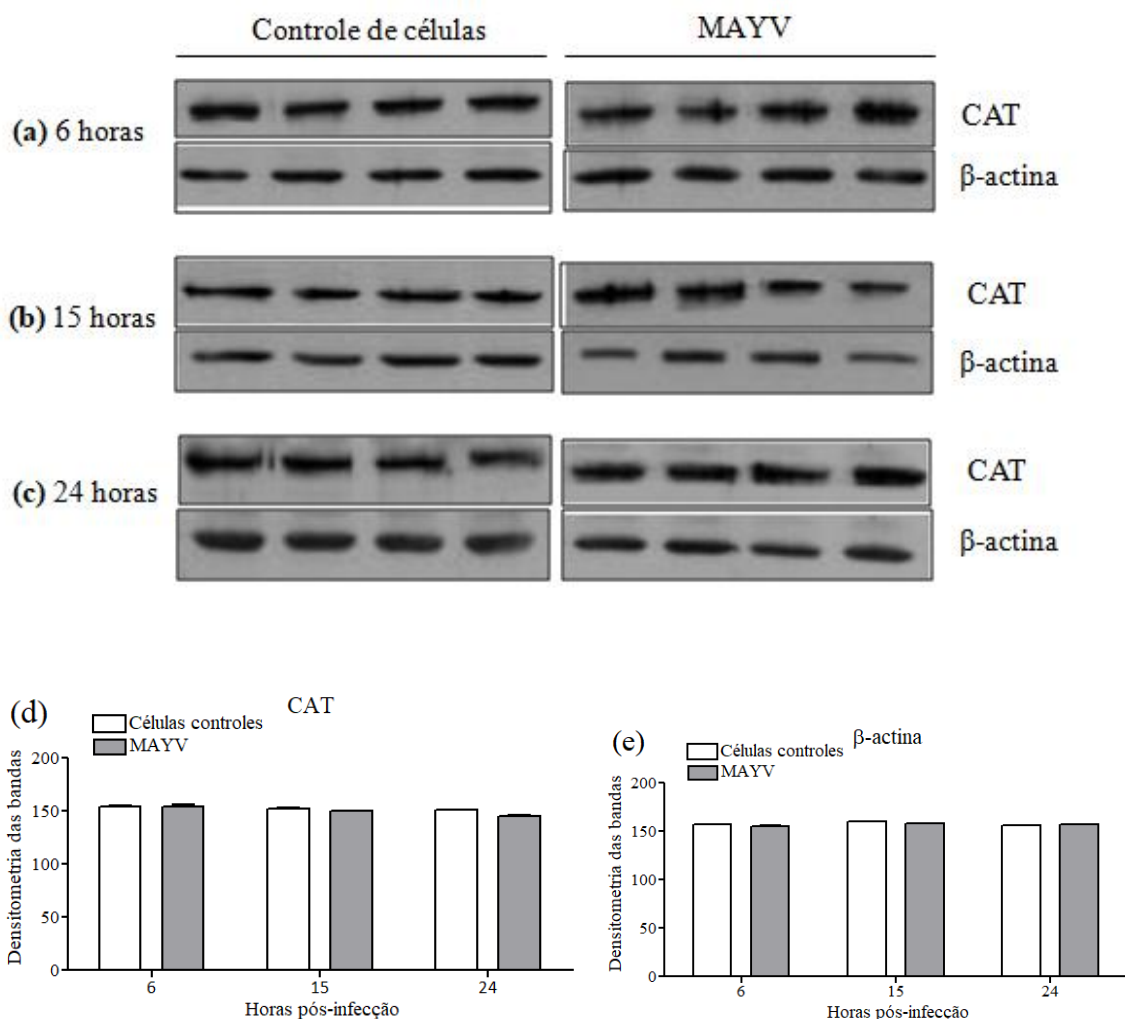
Uma vez que a infecção pelo MAYV alterou a atividade e expressão gênica das enzimas SOD1 e CAT, nossa próxima abordagem foi verificar se a infecção também seria capaz de alterar a expressão proteica dessas enzimas. Para isso foram feitas análises por Western blot, utilizando-se anticorpos primários específicos anti-SOD1 e anti-CAT. A expressão proteica da  $\beta$ -actina foi feita como controle interno da expressão de proteínas celulares.

A Figura 20 (a-c) mostra os painéis radiográficos obtidos para as proteínas SOD1 e  $\beta$ -actina. Observando-se os painéis, nas células infectadas pelo MAYV, em relação ao controle de células, nota-se um discreto aumento da expressão proteica de SOD1 nos tempos de 6 e 15h. As análises densitométricas das bandas (Figura 20d) confirmaram que houve aumento estatisticamente significativo na expressão proteica de SOD1 nas células infectadas com o MAYV nos tempos de 6 e 15h. A análise densitométrica das bandas referentes à  $\beta$ -actina não mostrou diferenças significativas entre as células controles e infectadas.

Em relação à expressão proteica da CAT, os painéis da Figura 21 (a-c) mostram que não houve alteração na expressão dessa proteína nas células infectadas, em todos os tempos analisados, em comparação aos seus controles. As análises densitométricas das bandas apresentadas na Figura 21 (d,e) confirmaram que não houve alterações significativas nas expressões proteicas de CAT e de  $\beta$ -actina.



**Figura 20: Expressão proteica de SOD1 em células HepG2 infectadas ou não com MAYV.** Extratos proteicos totais de células controles e infectadas com o MAYV (moi de 5) em diferentes horas foram submetidos ao ensaio de Western blot, utilizando-se anticorpo anti-SOD1 e anti- $\beta$ -actina. Paineis radiográficos obtidos das células controles e infectadas após 6h (a), 15h (b) e 24h (c). Densitometria das bandas obtidas para SOD1 (d) e  $\beta$ -actina (e). \*\*\* $p \leq 0,001$  em comparação às células controles (teste t-Student).



**Figura 21: Expressão proteica de CAT em células HepG2 infectadas ou não com MAYV.** Extratos proteicos totais de células controles e infectadas com o MAYV (moi de 5) em diferentes horas foram submetidos ao ensaio de Western blot, utilizando-se anticorpo anti-CAT e anti- $\beta$ -actina. Painéis radiográficos obtidos das células controles e infectadas após 6h (a), 15h (b) e 24h (c). Densitometria das bandas obtidas para CAT (d) e  $\beta$ -actina (e).

#### 5.4 – Avaliação da atividade antiviral global da silimarina contra o MAYV

##### 5.4.1 – Determinação da $CC_{50}$

Para avaliar *in vitro* se a silimarina poderia apresentar atividade anti-MAYV, primeiramente avaliamos sua toxicidade em células Vero e HepG2 através do ensaio de MTT. Como pode ser visto na Tabela IV, as concentrações de silimarina que reduziram 50% da viabilidade



celular ( $CC_{50}$ ) nas células Vero e HepG2 foram 137,52 e 105,9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Não houve citotoxicidade observada para células tratadas com 0,1% de DMSO (concentração final de solvente usado para dissolver a silimarina nos meios de cultura de células).

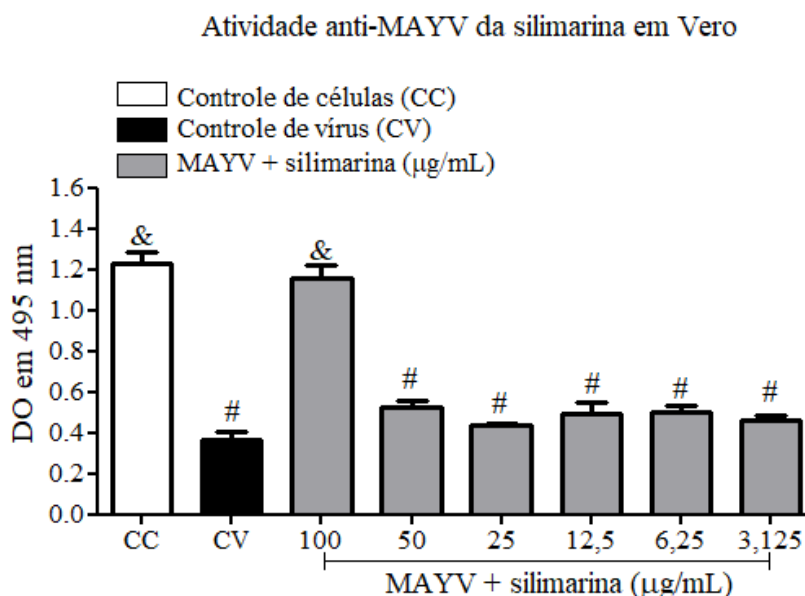
**Tabela IV:** Concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) da silimarina em Vero e HepG2

	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Células Vero	Células HepG2
<b>Silimarina</b>	137,52	105,9

#### 5.4.2 – Avaliação da atividade antiviral da silimarina contra o MAYV

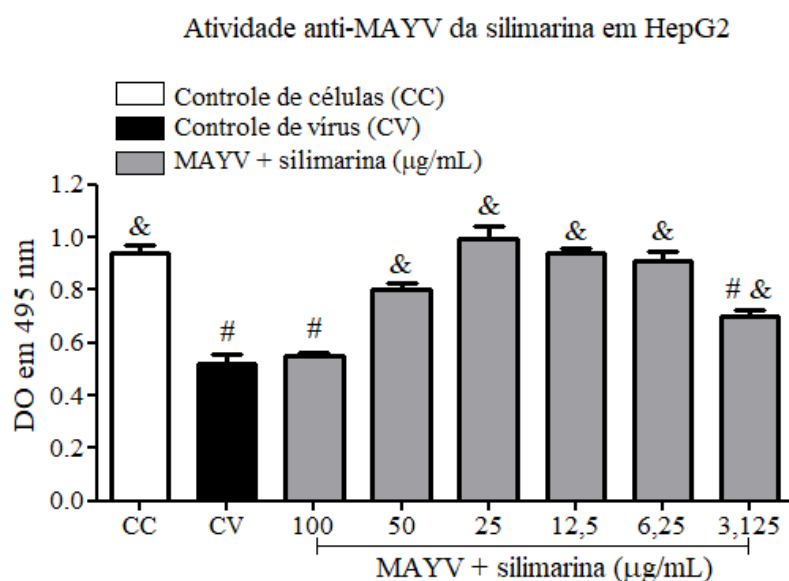
Em seguida, para avaliar se a silimarina apresentaria atividade antiviral contra o MAYV, fez-se, em células Vero e HepG2, um ensaio de atividade antiviral global utilizando-se o MTT, que avaliou a viabilidade das células após a infecção e tratamento.

Como mostra a Figura 22, em células Vero, a silimarina apresentou atividade anti-MAYV na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Nessa concentração, as células tratadas com silimarina e infectadas com MAYV apresentaram viabilidade celular igual ao controle de células (CC) e diferente do controle de vírus (CV). Nas demais concentrações de silimarina utilizadas (50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125  $\mu\text{g/mL}$ ), não houve proteção das células contra a infecção pelo MAYV uma vez que a viabilidade celular observada foi semelhante à observada no controle de vírus (CV). A análise das células sob microscópio ótico mostrou que o ECP do MAYV nos poços tratados 100  $\mu\text{g/mL}$  de silimarina foi totalmente abolido (dados não mostrados).



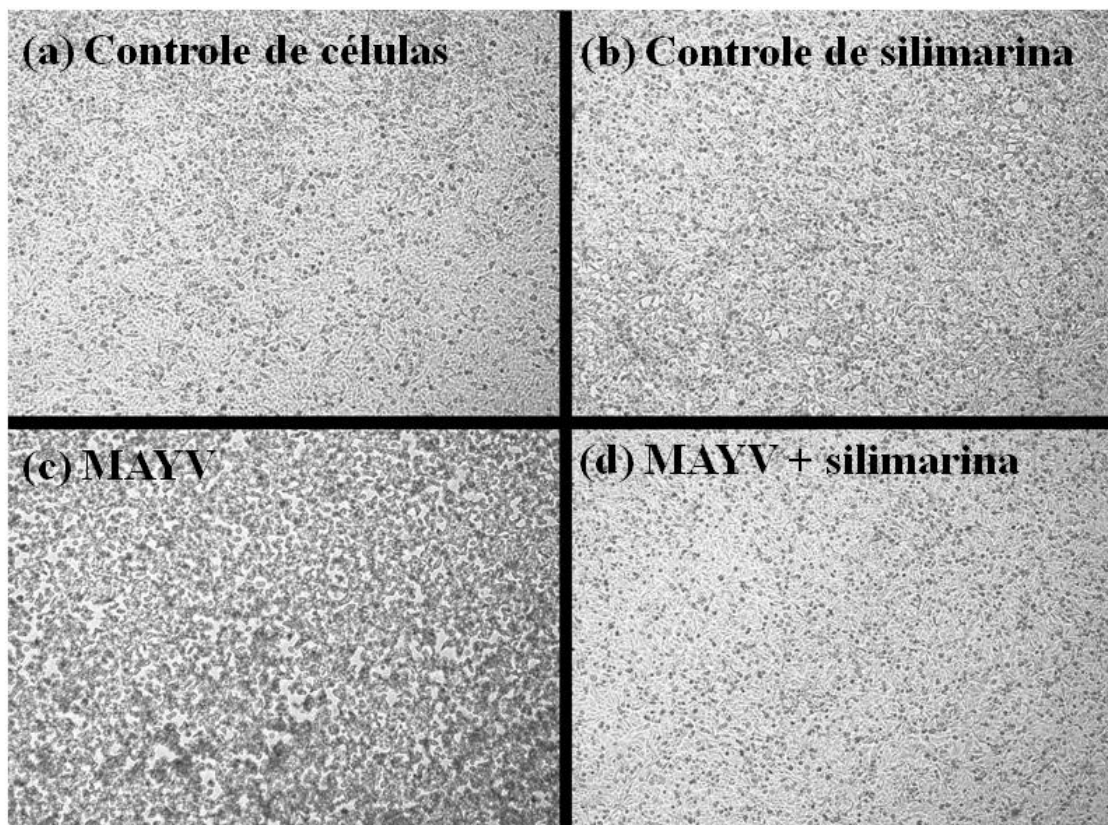
**Figura 22: Atividade antiviral global da silimarina contra o MAYV em células Vero.** As células foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e tratadas com a silimarina nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL. Após 48h avaliou-se a atividade global anti-MAYV pelo ensaio de MTT. Os resultados incluem dados de dois experimentos (média ± DP,  $n=16$ ). DO: densidade ótica a 495 nm. & indica diferenças em relação ao controle de vírus (CV) e # indica diferenças em relação a controle de células (CC). Foram considerados valores de  $p \leq 0,05$  usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey.

A Figura 23 mostra que, assim como ocorreu em células Vero, a silimarina também apresentou atividade anti-MAYV em células HepG2, porém em diferentes concentrações. Na concentração de 100 µg/mL, a silimarina não foi capaz de proteger a infecção pelo vírus uma vez que a viabilidade observada nessas células foi diferente da observada no controle de células (CC) e igual à observada no controle de vírus (CV). No entanto, nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL, a silimarina protegeu as células da infecção pelo MAYV uma vez que a viabilidade celular observada nesses tratamentos foi igual ao controle de células (CC) e diferentes do controle de vírus (CV).



**Figura 23: Atividade antiviral global da silimarina contra o MAYV em células HepG2.** As células foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e tratadas com a silimarina nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL. Após 48h avaliou-se a atividade global anti-MAYV pelo ensaio de MTT. Os resultados incluem dados de dois experimentos (média ± DP,  $n=16$ ). DO: densidade ótica a 495 nm. & indica diferenças em relação ao controle de vírus (CV) e # indica diferenças em relação a controle de células (CC). Foram considerados valores de  $p \leq 0,05$  usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey.

A Figura 24 (a-d) mostra fotos de microscopia ótica de células HepG2 infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e tratadas ou não com a silimarina (25 µg/mL). Como pode ser observado na Figura 24d, a silimarina foi capaz de inibir de forma eficiente o efeito citopático do MAYV em células HepG2.



**Figura 24: Análise da redução do efeito citopático do MAYV em células HepG2 tratadas com silimarina. (a)** Células controles não tratadas e não infectadas. **(b)** Células controles tratadas com 25 µg/mL de silimarina. **(c)** Células infectadas com o MAYV (moi de 5). **(d)** Células infectadas e tratadas com a silimarina na concentração de 25 µg/mL. As fotos foram tiradas após 48h. Aumento de 100X.

#### 5.4.3 – Cálculo da $CE_{50}$ e do Índice de Seletividade (IS)

O efeito antiviral da silimarina também foi avaliado calculando-se a Concentração Efetiva para 50% das células ( $CE_{50}$ ) e o Índice de Seletividade (IS) para o MAYV, em células Vero e HepG2.

A Tabela V mostra que as  $CE_{50}$  da silimarina em células Vero e HepG2 foram 64,63 e 3,58 µg/mL, respectivamente. Ou seja, nessas concentrações, 50% das células foram protegidas da infecção pelo MAYV. Nas concentrações de 100 µg/mL em Vero e 25 µg/mL em HepG2 houve proteção de 99,3% e 100%, respectivamente. Observa-se que esses valores confirmaram o que foi observado nos resultados da atividade antiviral global pelo MTT. Os IS da silimarina em células Vero e HepG2 foram de 2,13 e 29,6, respectivamente.

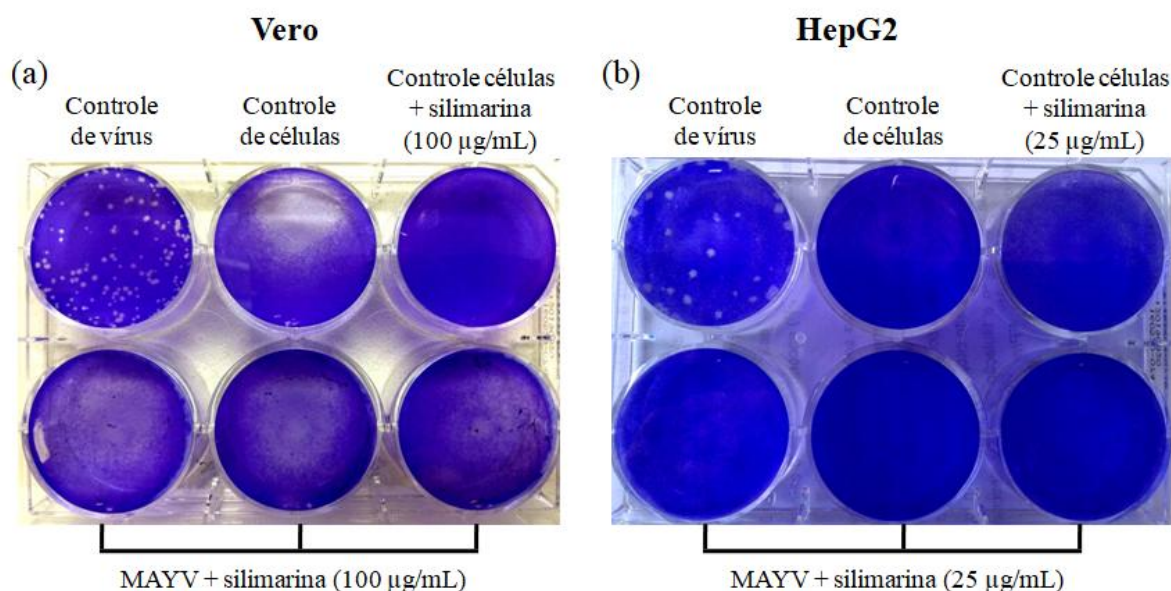
**Tabela V:** Concentração Efetiva para 50% das células ( $CE_{50}$ ) e Índice de Seletividade (IS) da silimarina em células Vero e HepG2.

	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		IS para MAYV	
	Células Vero	Células HepG2	Células Vero	Células HepG2
<b>Silimarina</b>	64,63	3,58	2,13	29,6

### 5.5 – Avaliação da atividade antiviral da silimarina contra o MAYV pelo Ensaio de Redução de Placa

Para corroborar com os resultados obtidos, fizemos também o ensaio de redução de placa. Para tal, células Vero e HepG2 foram implantadas em placas de 6 poços, infectadas com moi de 0,01 e tratadas com 100 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de silimarina, respectivamente (doses que apresentaram atividade antiviral). Após 2 e 5 dias da infecção (para células Vero e HepG2, respectivamente), as células foram fixadas e coradas, sendo as UFP observadas e contadas.

Como se pode observar na Figura 25, houve redução de 100% das UFP nas células Vero e HepG2 infectadas com o MAYV e tratadas com 100 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de silimarina, respectivamente.



**Figura 25:** Atividade antiviral da silimarina contra o MAYV pelo Ensaio de Redução de Placa. Células Vero (a) e HepG2 (b) foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 0,01). Após adsorção foi adicionado aos controles de vírus e células, meio com carboximetilcelulose (CMC) 2% SFB. Nos demais poços foram adicionados meio com CMC 2% SFB e silimarina nas concentrações indicadas. Após os respectivos dias de infecção realizou-se a revelação e observação das UFP.

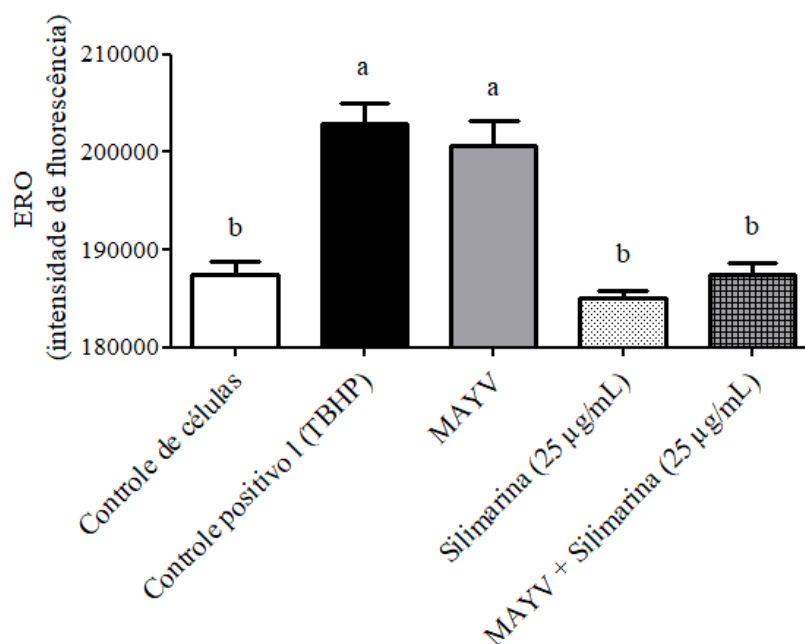
## 5.6 – Avaliação do *status* redox em células HepG2 infectadas com o MAYV e tratadas com a silimarina

Uma vez que nossos resultados mostraram que o MAYV é capaz induzir estresse oxidativo em células HepG2 e que a silimarina apresenta atividade anti-MAYV, somada à sua efetiva atividade antioxidante demonstrada em outros trabalhos, nosso próximo passo foi avaliar se a silimarina poderia restabelecer a homeostase redox celular após a infecção pelo MAYV. Para tal, em células HepG2 infectadas ou não com o MAYV e tratadas com a silimarina (25 µg/mL), foram avaliados os níveis de ERO, MDA e proteína carbonilada.

### 5.6.1 – Dosagem de ERO

A dosagem de ERO foi realizada conforme descrito no item 4.5. Entretanto, a infecção com o MAYV (moi de 5) foi feita em meio contendo 25 µg/mL de silimarina. Após 24h, as células foram carregadas com a sonda carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA e a intensidade de fluorescência foi medida.

A Figura 26 mostra que nas células tratadas com hidroperóxido *tert*-butil (TBHP), um indutor de ERO, e nas células infectadas com o MAYV, houve um aumento na produção de ERO, em relação às células controles. Por sua vez, o tratamento das células infectadas com a silimarina (25 µg/mL) foi capaz de reduzir a produção de ERO, chegando a valores iguais aos observados no controle de células.



**Figura 26: Efeito do tratamento com silimarina na produção de ERO em HepG2 infectadas pelo MAYV.** As células foram infectadas com o MAYV (moi de 5) em meio de cultura contendo 25 µg/mL de silimarina. Após 24h, as células foram carregadas com 25 µM da sonda carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA e a intensidade de fluorescência foi medida. Os resultados incluem dados de dois experimentos (média ± DP,  $n=24$ ). Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos, usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatísticas para  $p \leq 0,05$ . TBPH: hidroperóxido *tert*-butil (controle positivo).

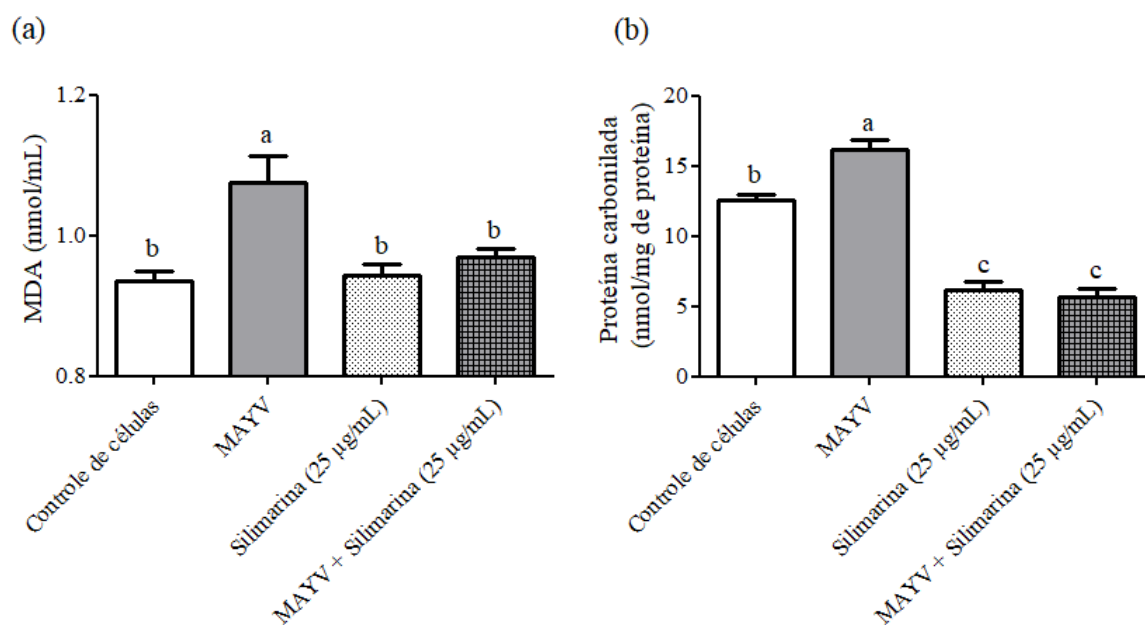
### 5.6.2 – Dosagem de MDA e proteína carbonilada

Uma vez que a silimarina reduziu a produção de ERO em células infectadas pelo MAYV, nosso próximo objetivo foi avaliar se esse composto também reduziria o estresse oxidativo após a infecção viral. Para a realização desses experimentos, após a adsorção viral, meio contendo 25 µg/mL de silimarina foi adicionado às células e após 24h foram feitas as dosagens de MDA e proteína carbonilada.

Como mostra a Figura 27a, nas células infectadas com o MAYV houve um aumento nos níveis de MDA em relação às células controles, confirmando os resultados obtidos anteriormente (Figura 15). Por sua vez, o tratamento das células infectadas com a silimarina (25 µg/mL) foi capaz de diminuir os níveis de MDA, igualando-se aos observados em células controles, mostrando assim que a silimarina foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica ocasionada pelo MAYV.

Na Figura 27b, podemos observar que, em relação às células controles, a infecção pelo MAYV foi capaz de causar um aumento nos níveis de proteína carbonilada, confirmando os

resultados obtidos anteriormente (Figura 16). Ainda, nas células controles de silimarina e infectadas com o MAYV e tratadas com a silimarina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), houve uma redução significativa nos níveis de proteína carbonilada, sendo esses valores menores que os observados no controle de células. Assim, podemos inferir que a silimarina foi capaz de proteger as células da oxidação proteica.



**Figura 27: Silimarina protege células HepG2 contra o estresse oxidativo induzido pelo MAYV.** Células HepG2 foram infectadas ou não com o MAYV (moi de 5) e após adsorção foram tratadas ou não com a silimarina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após 24h, as células foram coletadas para a dosagem de MDA (a) e proteína carbonilada (b). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SD ( $n=9$ ). Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos, usando one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatísticas para  $p \leq 0,05$ .



## 6 – DISCUSSÃO

O MAYV foi primeiramente isolado em 1954, desde então, muitos estudos têm sido conduzidos tentando elucidar algumas de suas características estruturais, patogênicas e principalmente epidemiológicas. Existem cerca de 150 artigos publicados com o MAYV desde 1957 e esse número tende a aumentar devido à sua atual importância como potencial vírus emergente, bem como de outros vírus estreitamente relacionados, como o CHIKV.

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar se a infecção pelo MAYV poderia culminar no estresse oxidativo e/ou alterar as defesas antioxidantes celulares. Adicionalmente, uma vez comprovada a presença do estresse oxidativo durante a infecção, prospectar o uso de algum composto antioxidante como restaurador do equilíbrio redox.

Os experimentos foram conduzidos em células hepáticas humanas, HepG2, pois, sabe-se que o fígado é um importante órgão que, logo após a infecção, suporta a multiplicação viral (Assunção-Miranda et al., 2013). Primeiramente, confirmamos por meio da cinética de crescimento que as células HepG2 foram suscetíveis e permissivas à multiplicação do MAYV, como observado na Figura 13a, pois houve um aumento exponencial na produção de vírus com o decorrer das horas pós-infecção.

A viabilidade das células HepG2 infectadas com o MAYV, conforme mostra a Figura 13b, começou a cair no tempo de 24h. Assim, todos os experimentos foram realizados até esse tempo para garantir que a morte de um grande número de células não alteraria a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Ainda, o MAYV foi capaz de causar ECP característico em células HepG2, como mostrado na Figura 13c, sendo esse caracterizado pelo aparecimento de pequenos focos de células arredondadas e refringentes, que com o decorrer da infecção, se desprenderam da monocamada levando a destruição das células.

O próximo passo foi então verificar se a infecção pelo MAYV poderia levar a uma maior produção de ERO e ao estresse oxidativo. A primeira evidência de que um vírus poderia induzir o estresse oxidativo aumentando os níveis de ERO foi publicada em 1979 (Peterhans, 1979). Desde então, muitos estudos mostraram que diferentes vírus podem induzir estresse oxidativo através de diferentes vias, podendo influenciar diretamente na patogênese viral. Alguns exemplos de vírus que induzem estresse oxidativo são: HPV, HBV, HCV, DENV e

HIV (Sumida et al., 2000; Mahmood et al., 2004; Bolukbas et al., 2005; Higgs et al., 2014; Williams et al., 2014).

Foi demonstrado neste trabalho que a infecção pelo MAYV levou a um aumento significativo nos níveis de ERO nas células HepG2, nos diferentes tempos analisados (Figura 14). Semelhante ao nosso resultado, a infecção de células HepG2 com DENV-2 também aumentou a produção de ERO no tempo de 24 hpi (Wang et al., 2013). Outros tipos celulares infectados com o *Herpes simplex virus type I* (HSV-1), *Sendai virus* (SEV), HIV e DENV também tiveram um aumento na geração de ERO (Palamara et al., 1995; Ciriolo et al., 1997; Wang et al., 2013). Ainda, considerando o MAYV, Cavalheiro et al. (2016) demonstraram que células de macrófagos murinos RAW 264.7 infectadas por esse vírus também apresentaram um aumento na geração de ERO nos tempos iniciais da infecção.

O efeito das ERO nas funções celulares depende da quantidade de ERO presente e do tempo em que a célula foi exposta a elas (Reshi et al., 2014; Camini et al., 2017). No contexto das infecções virais, sabe-se que, inicialmente, as ERO são importantes para combaterem a infecção e são vistas como um mecanismo de proteção primário da célula hospedeira (Jacobson, 1996). No entanto, com o avanço da multiplicação viral, mais ERO se formam, causando um desequilíbrio na homeostase redox, podendo culminar com o estresse oxidativo. Nessa condição, as células sofrem danos no DNA, lipídeos e proteínas, o que leva à perda da integridade e funcionalidade celulares (Halliwell e Gutteridge, 1999). Além disso, já foi demonstrado que para alguns vírus, o estresse oxidativo pode favorecer a multiplicação viral (Reshi et al., 2014).

Assim, como observamos aumento das ERO após infecção pelo MAYV, o próximo passo foi avaliar se esse aumento seria capaz de induzir o estresse oxidativo. Para tal, avaliamos dois biomarcadores indiretos desse evento, MDA e proteína carbonilada. O MDA é um subproduto da peroxidação lipídica e a proteína carbonilada é o produto da oxidação não enzimática irreversível ou carbonilação das proteínas, que muitas vezes leva à perda da função proteica (Dalle-Donne et al., 2006). Os níveis de MDA apresentaram-se elevados nas células infectadas em todos os tempos analisados (Figura 15). Já os níveis de proteína carbonilada mostraram-se elevados nas células infectadas 24 hpi (Figura 16). Dessa forma, podemos inferir que o estresse oxidativo ocorre após a infecção celular pelo MAYV.

Similar aos nossos resultados, Dhanwani et al. (2012) encontraram níveis elevados de MDA em células de neuroblastoma SH-SY5Y infectadas com o CHIKV, nos tempos de 36 e

48 hpi. Huang et al. (2010) mostraram que camundongos infectados com o RSV apresentaram aumento nos biomarcadores de estresse oxidativo, bem como aumento nos níveis de  $\text{OH}^\cdot$  e NO. Ainda, pacientes infectados com HCV apresentaram níveis elevados de vários biomarcadores de estresse oxidativo, em amostras de soro e biópsia hepática, incluindo 8-hidroxi-dioxiguanosina (8-OHdG, indicador de dano ao DNA), MDA e tioredoxina (Sumida et al., 2000; Mahmood et al., 2004).

Uma vez que o estresse oxidativo é caracterizado pela presença de altas quantidades de ERO e/ou um sistema antioxidante ineficiente (Dröge, 2002), foi avaliado também se houve alteração nesse sistema após infecção pelo MAYV. Os resultados obtidos mostraram que houve aumento na atividade da enzima SOD nas células infectadas, em todos os tempos avaliados (Figura 18a). Como a SOD converte o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , acredita-se que houve também um acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular. Assim, uma vez que o ciclo redox da glutathiona e a enzima CAT são os responsáveis por inativar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio, foram avaliados também o conteúdo total de glutathiona celular, a razão GSH/GSSG e a atividade da enzima CAT.

Nas células infectadas com o MAYV, houve aumento na atividade da CAT no tempo de 15 hpi (Figura 18b) e aumento do conteúdo total de glutathiona nas células infectadas nos tempos de 6 e 15 h, retornando a níveis iguais das células controles no tempo de 24 h (Figura 17a). Já a relação GSH/GSSG nas células infectadas aumentou no tempo de 6 h e diminuiu nos tempos de 15 e 24 h (Figura 17b).

Portanto, com esses resultados podemos inferir que, durante a infecção pelo MAYV, as células produziram grandes quantidades de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para tentar conter a infecção, e a atividade da SOD aumentou na tentativa de converter o excesso dessa ERO em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nas primeiras horas pós-infecção (6 e 15), o aumento observado na atividade CAT e/ou no conteúdo de total de glutathiona pode ter sido uma tentativa de manter a homeostase redox celular, inativando o excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No entanto, esse aumento nas defesas antioxidantes nas primeiras horas após a infecção pelo MAYV não foram suficientes em prevenir o estresse oxidativo, pois níveis aumentados de MDA nas células infectadas foram observados nestes tempos.

Com o progresso da infecção (24 h), a diminuição da atividade da CAT e do conteúdo total de glutathiona sugerem que as células infectadas acumularam  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esse excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ter contribuído para um estresse oxidativo mais significativo nesse tempo, que foi confirmado pelos maiores valores de MDA (Figura 15) e proteína carbonilada (Figura 16) nas

células infectadas. Adicionalmente, uma redução progressiva na razão GSH/GSSG (Figura 17b) reforça esse aumento de estresse oxidativo com o avanço da infecção.

Adicionalmente, uma vez que a infecção pelo MAYV alterou a atividade das enzimas SOD e CAT, nossa próxima pergunta foi se a infecção poderia alterar de alguma forma a expressão gênica e proteica dessas enzimas. Para a isoforma SOD1, que é a mais abundante na célula, encontramos um aumento na sua expressão gênica 15 hpi (Figura 19a) e um aumento na sua expressão proteica 6 e 15 hpi (Figura 20). Esses resultados corroboram com a maior atividade total de SOD observada nos tempos 6 e 15 hpi. No entanto, nenhuma correlação entre atividade, expressão gênica e proteica de SOD foi observada no tempo de 24 hpi. Isso pode ser explicado em parte considerando que existem na célula outras isoformas de SOD (SOD2 e SOD3), e que a expressão gênica e proteica dessas isoformas não foram aqui avaliadas. Em relação à atividade, expressão gênica e proteica de CAT, não foi possível correlacionar os resultados aqui obtidos. Nas células infectadas, a atividade de CAT aumentou 15 hpi (Figura 18b), a expressão do RNAm diminuiu em todos os tempos analisados (Figura 19b) e a expressão proteica não alterou (Figura 21). Assim, uma vez inconclusivos alguns experimentos deverão ser refeitos, principalmente aqueles avaliando a expressão gênica dessa enzima.

Entretanto, essas diferenças entre atividade e expressões gênica e proteica podem estar relacionadas à presença do vírus, que modifica todo o ambiente celular impossibilitando, em certos momentos, a correlação entre esses parâmetros. Isso foi observado em diferentes trabalhos, como por exemplo, o de Hosakote et al. (2009), que mostraram que o RSV é capaz de modular o sistema antioxidante, contribuindo assim para sua patogênese. Os autores infectaram células epiteliais das vias aéreas com o RSV e observaram que a infecção induziu a produção de ERO, aumentou os produtos de peroxidação lipídica e diminuiu a expressão de SOD1, SOD3, CAT e GST, com um ligeiro aumento na SOD2. Além disso, houve um aumento na atividade de SOD e diminuição da CAT, GPx e GST.

Outro estudo que mostra essa modulação das defesas antioxidantes é o de Kaul et al. (2002), que mostraram que a infecção de células epiteliais brônquicas pelo *Rhinovirus* induziu a formação de ERO e aumentou a expressão de SOD1 e a atividade de SOD total nas fases iniciais da infecção, sem alterações na SOD 2, CAT e GPx.

São diversos os trabalhos que corroboram os nossos resultados, mostrando que por diferentes meios os vírus são capazes de alterar o sistema redox celular. Dhanwani et al.

(2012) mostraram que células de neuroblastoma SH-SY5Y infectadas com CHIKV apresentaram diminuição acentuada nos níveis transcricionais de SOD e CAT com o avanço da infecção. Kumar et al. (2009) observaram que a infecção pelo *Japanese encephalitis virus* (JEV) aumentou os níveis de SOD no cérebro de ratos na tentativa de suprimir os altos níveis de  $O_2^{\cdot-}$ . Segundo Foppoli et al. (2015) a infecção por HPV confere às células a capacidade de sobreviver em um ambiente oxidante através de diferentes mecanismos, como aumento nas enzimas SOD e CAT. Ainda, Yoshinaka et al. (1999) demonstraram que o *Alphavirus* SINV causou infecção persistente nas células de pulmão fetal humano (MCR-5) e que essa persistência foi devido ao acúmulo de grandes quantidades de Mn-SOD (SOD2) nas células infectadas. Os autores sugeriram que um fator celular que regula a via oxidativa modulou o resultado da infecção pelo SINV, salientando-se a importância do estresse oxidativo nas infecções por *Alphavirus*.

Similar às alterações observadas em células HepG2, o nosso grupo de pesquisa também encontrou alterações no ambiente redox de células J774 (macrófago murino) infectadas pelo MAYV (Caetano et al., 2016). Entre outros resultados, também foi observado aumento da produção de ERO, dos níveis de MDA e da atividade total de SOD após infecção.

Em relação ao ciclo redox da glutathiona, Tian et al. (2010) demonstraram que a infecção por DENV-2 diminuiu significativamente os níveis de glutathiona em células HepG2 e que a produção de novas partículas virais diminuiu consideravelmente após o tratamento com glutathiona exógena. Wang et al. (2013) mostraram que camundongos infectados com DENV-2 apresentaram aumento de MDA e da razão GSSG/GSH, além de uma diminuição na atividade de CAT e SOD. Este estudo sugere que a glutathiona exógena pode ser um agente terapêutico promissor para a prevenção do dano oxidativo hepático durante a infecção por DENV. Além disso, a infecção pelo RSV também aumentou o estresse oxidativo em crianças com bronquiolite aguda. Houve aumento das concentrações de GSSG e GPx, e correlação positiva de GSSG com a gravidade da doença (Moreno-Solís et al., 2015). Recentemente, demonstramos que a glutathiona endógena pode estar envolvida na neutralização das ERO e constitui um sistema celular importante capaz de manter a homeostase oxidativa em fígados de camundongos infectados com o *Caraparu virus* (Camini et al., 2014).

Além dessas alterações no sistema antioxidante, nós verificamos que a infecção pelo MAYV em células HepG2 também foi capaz de causar um aumento significativo na expressão gênica da citocina pró-inflamatória IL-6 (dados não mostrados). Dhanwani et al.

(2012) mostraram que células SH-SY5Y infectadas com CHIKV apresentaram diminuição da expressão de glutathione e das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e GST. Os níveis de MDA aumentaram em todos os tempos analisados pós-infecção. Além disso, houve um aumento nos níveis das citocinas inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1, mostrando inflamação na infecção neuronal induzida pelo CHIKV. Os níveis elevados dessas citocinas durante a infecção também podem ativar e agravar o efeito citopático induzido pelo vírus, estresse e apoptose.

Assim, como demonstramos que a infecção pelo MAYV foi capaz de aumentar os níveis de ERO, induzir o estresse oxidativo e alterar as defesas antioxidantes celulares, nossa próxima pergunta foi se o uso de alguma substância antioxidante poderia reverter o desequilíbrio redox após a infecção pelo MAYV.

Por conseguinte, buscamos na literatura um possível composto natural com conhecida atividade antioxidante que pudesse ser usado no nosso sistema celular. Sabe-se que, ao longo da história da humanidade, milhares de plantas biologicamente ativas foram identificadas e usadas na medicina. Nesse sentido, nos últimos anos, houve um grande interesse da comunidade científica em investigar metabólitos produzidos pelas plantas, como os flavonoides, cujas propriedades benéficas à saúde humana tenham sido demonstradas, por exemplo, efeito antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno, antibacteriano, antifúngico e antiviral.

Dentre vários possíveis compostos descritos, a silimarina nos chamou atenção devido inúmeros trabalhos mostrando sua significativa atividade antioxidante, anti-inflamatória e antifibrotica (Federico et al., 2017). Ainda, recentemente, uma efetiva atividade antiviral da silimarina contra o CHIKV foi demonstrada por Lani et al. (2015). Brevemente, os autores mostraram que a silimarina exibe significativa atividade anti-CHIKV, reduzindo a multiplicação do vírus e diminuindo a expressão de proteínas virais envolvidas com o ciclo replicativo.

Assim, devido aos seus conhecidos efeitos antioxidantes e anti-CHIKV (vírus intimamente relacionado ao MAYV), foi avaliado se a silimarina poderia apresentar também ação antiviral contra o MAYV e restaurar o equilíbrio redox celular após a infecção.

Foi observado nos resultados obtidos que a silimarina também apresenta significativa atividade anti-MAYV, tanto em células Vero como em HepG2 (Figuras 22 e 23). Em relação às CC<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub> (Tabelas IV e V), constatou-se que os valores obtidos das CE<sub>50</sub> em ambas as células foram menores que os valores das CC<sub>50</sub>, isso mostra que a concentração em que a

silimarina é eficaz contra a infecção viral é menor que a concentração necessária para matar as células por seus efeitos citotóxicos.

Ainda, a  $CC_{50}$  da silimarina em HepG2 foi de 105,9  $\mu\text{g/mL}$ , a  $CE_{50}$  foi baixa (3,58  $\mu\text{g/mL}$ ) e o IS foi de quase 30, mostrando que a silimarina apresenta atividade antiviral numa concentração 30x menor que a citotóxica para a célula. Valores de IS acima de 10 são considerados seguros e com possibilidade de ausência total de toxicidade (Aguiar, 2011), por isso, o efeito antiviral da silimarina encontrado neste trabalho é devido à sua capacidade antiviral e não à sua citotoxicidade.

De maneira geral, os resultados aqui obtidos mostraram que a silimarina protegeu as células do efeito citopático induzido pelo MAYV, confirmado pelo ensaio de MTT, e inibiu a replicação do MAYV, representado pela diminuição do número de UFP. Ou seja, nosso estudo mostrou que a silimarina exibe significativa atividade antiviral *in vitro* contra o MAYV.

Por fim, considerando a atividade antioxidante da silimarina, nós investigamos se ela poderia diminuir o dano celular oxidativo induzido pela infecção pelo MAYV. Nós vimos que o tratamento das células HepG2 com a silimarina (25  $\mu\text{g/mL}$ ) diminuiu significativamente a produção de ERO em resposta à infecção por MAYV, 24 hpi (Figura 26). Adicionalmente, nesse mesmo tempo, o tratamento com a silimarina reduziu os biomarcadores de estresse oxidativo MDA e proteína carbonilada nas células infectadas (Figura 27a, b). Ou seja, a silimarina efetivamente protegeu as células do dano oxidativo associado à infecção pelo MAYV.

Portanto, em conjunto, esses resultados apontam para o potencial da silimarina em ser usada no tratamento das infecções causadas pelo MAYV. No entanto, como parte de um possível processo de avaliação do uso da silimarina na abordagem terapêutica contra a febre Mayaro, mais estudos são necessários como: avaliar a atividade antiviral *in vivo*, rota de administração, biodisponibilidade, disponibilidade no local da infecção/inflamação, farmacocinética e toxicidade.

## 7 - CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, propomos um modelo baseado nos possíveis fatores que contribuíram para o desenvolvimento de estresse oxidativo em diferentes tempos após infecção pelo MAYV (Figura 28). Quando a célula é infectada, a produção de ERO aumenta numa tentativa de combater a infecção. A primeira ERO produzida na via de redução do oxigênio é o  $O_2^-$ , que é metabolizado a  $H_2O_2$  pelas enzimas SOD. Observamos aumento dessas enzimas no momento inicial pós-infecção (6 h). No entanto, a superprodução de  $O_2^-$  pode ter ocorrido e, conseqüentemente, parte dessa espécie não foi suficientemente inativada, resultando no seu acúmulo dentro da célula. Além disso, também no tempo de 6 hpi, acredita-se que houve acúmulo de  $H_2O_2$ , uma vez que nenhuma alteração na atividade da CAT foi detectada e, apesar do aumento observado no conteúdo total de glutatona, a maior parte desta encontrava-se em sua forma reduzida (GSH), já que a razão GSH/GSSG nas células infectadas foi maior que nas células controles. Assim, esse excesso de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  no tempo de 6 h pode ter contribuído para o estresse oxidativo, observado pelo aumento de MDA.

No tempo de 15 hpi, houve aumento da atividade de SOD, CAT e diminuição da razão GSH/GSSG, como resultado da conversão de glutatona reduzida em oxidada. No entanto, essa tentativa em combater o excesso de ERO não foi suficiente para impedir o estresse oxidativo observado nesse tempo (aumento de MDA). No tempo de 24 hpi o aumento da atividade de SOD não foi acompanhado pelo aumento da CAT, e os níveis de glutatona retornaram aos níveis das células controles, com diminuição da razão GSH/GSSG. Portanto, a infecção pelo MAYV provavelmente resultou em uma produção intracelular aumentada de  $H_2O_2$ .

Dessa forma, com o progresso da infecção e o aumento do título viral, houve aumento dos biomarcadores MDA e proteína carbonilada e alterações nos principais antioxidantes celulares, causando assim, aumento do estresse oxidativo. Adicionalmente, este trabalho mostrou que a silimarina, além de apresentar uma efetiva atividade antiviral contra o MAYV, também foi capaz de reverter o estresse oxidativo causado pela infecção. A capacidade da silimarina em reverter o dano oxidativo causado pela infecção pelo MAYV pode ter ocorrido em função da sua capacidade em inibir a infecção viral em conjunto com seu efeito antioxidante.



Estudos adicionais são necessários para melhor caracterizar a homeostase oxidativa na infecção pelo MAYV, o papel do estresse oxidativo na patogênese viral e o potencial uso da silimarina na abordagem farmacológica.

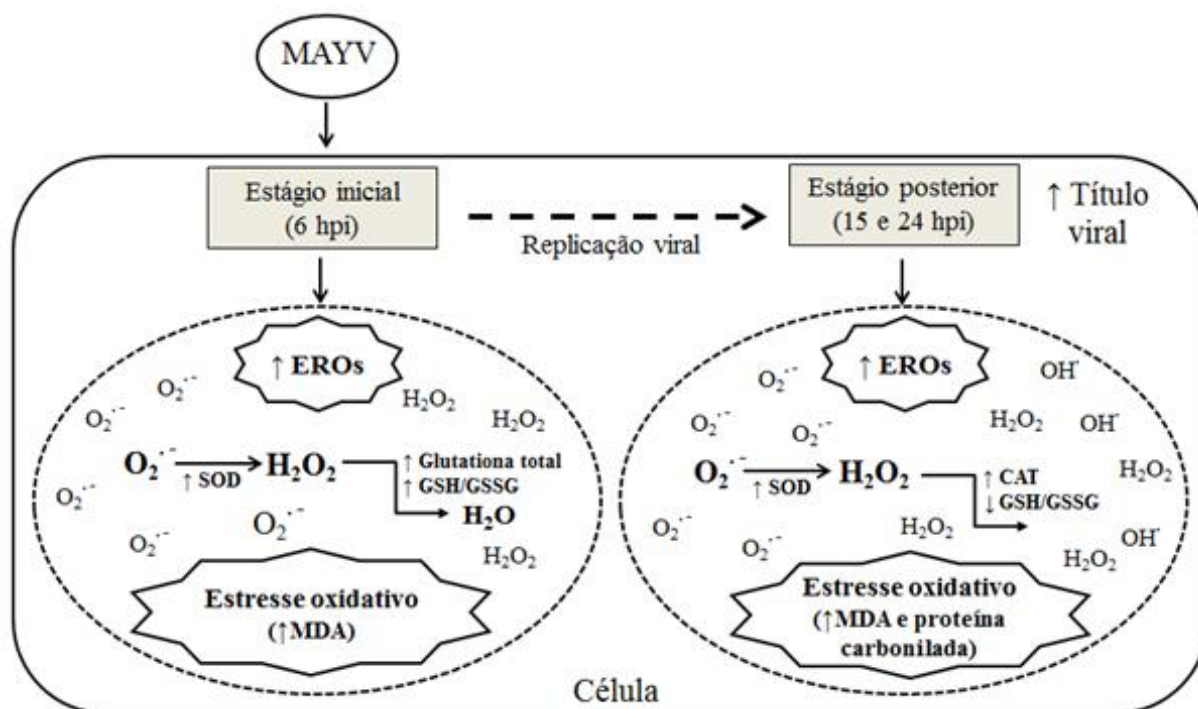


Figura 28: Representação esquemática dos possíveis fatores que contribuíram para o desenvolvimento do estresse oxidativo após infecção pelo MAYV em células HepG2.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelnabi R, Neyts J, Delang L. (2015). Towards antivirals against chikungunya virus. *Antiviral Research* 121. 59–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.017>.

Abel S, De Kock M, van Schalkwyk DJ et al. (2009). Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 81, p.391-399.

Abenavoli L, Capasso R, Milic N et al. (2010). Milk thistle in liver diseases: Past, present, future. *Phytother. Res.* 2010, 24, 1423–1432.

Aguiar ACC. (2011). Avaliação da atividade citotóxica e antimalárica de análogos da cloroquina. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Química e Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Aitken TH, Downs WG, Anderson CR et al. (1960). Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. *Science* 131, 986.

Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S et al. (1996). Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p. 2448-2453.

Albrecht T, Boldogh I, Fons MP (1992). Receptor-initiated activation of cells and their oncogenes by herpes-family viruses. *J. Invest. Dermatol* 98(6 Suppl): 29S–35S.

Al Mehdi, Dodia C, Jain MK et al. (1993). A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. *Biophys. Biochim. Acta*, v.1166, p.56-62.

Altenhofer S. (2012). The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2327–2343.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7915–7922.

Anderson CR, Downs WG, Wattlely GH et al. (1957). Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad. *B.W.I. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 6, 1012–1016.

Armogida M, Nisticò R, Mercuri NB. (2012). Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia. *Brit. J. Pharmacol.* 166, 1211–1224.

Assunção-Miranda I, Cruz-Oliveira C, Da Poian AT. (2013). Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. *Biomed. Res. Int.* 2013, 973516.

Auguste AJ, Liria J, Forrester NL et al. (2015). Evolutionary and ecological characterization of mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. *Emerg Infect Dis*;21:1742e50.

Azevedo RS, Silva EV, Carvalho VL et al. (2009). Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*15(11): 1830-1832.

- Barber AD & Harris SR. (1994). Oxygen free radicals and oxidants: a review. *Amer. Pharm.*, v.34, n.9, p.26-35.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1, 113-123.
- Batista PM, Andreotti R, Almeida PS et al. (2013). Detection of arboviruses of public health interest in free-living new world primates (*sapajus* spp.; *alouatta caraya*) captured in mato grosso do sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46(6), 684–690.
- Beckman KB & Ames BN. (1997). Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272. 19633–19636.
- Beckman JS & Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*; 87: 315–424.
- Bedard K & Krause KH. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- Bijak M. (2017). Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.) Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules* 2017, 22, 1942; doi:10.3390/molecules22111942.
- Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M et al. (2005). Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis* Oct 31;5: 95.
- Bronzoni RV, Moreli ML, Cruz AC et al. (2004). Multiplex nested PCR for Brazilian alphavirus diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98(8), 456–461.
- Brown LAS. (1994). Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am J Physiol*; 266: L172±L177.
- Burdon RH. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biol. & Med.* 18: 775–794.
- Caetano CCS, Camini FC, Almeida LT et al. (2016). Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em macrófagos murinos após infecção pelo *Mayaro virus (Togaviridae)*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFOP.
- Cai H & Harrison DG. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role oxidant stress. *Cir Res* 87.
- Calisher CH, Gutiérrez E, Maness KS et al. (1974). Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 8(3), 243–248.
- Camini FC, Almeida LT, Bernardes CS et al. (2014). Caraparú virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection. *Arch Virol.* 159:2621–2632.

Camini FC, Caetano CCS, Almeida LT et al. (2017). Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch Virol*. Apr;162(4):907-917. doi: 10.1007/s00705-016-3187-y.

Capasso. (2003). *A quick reference to herbal medicine*. Springer Verlag.

Carini R, Comoglio A, Albano E et al. (1992). Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. *Biochem Pharmacol*, v.43, n.10, p.2111-2115. 1992.

Casals J. (1957). Viruses: the versatile parasites; the arthropod-borne group of animal viruses. *Trans N Y Acad Sci*. 1957 Jan;19(3):219-35.

Casola A, Burger N, Liu T et al. (2001). Oxidant tone regulates RANTES gene transcription in airway epithelial cells infected with Respiratory Syncytial Virus: role in viral-induced Interferon Regulatory Factor activation. *J Biol Chem* 276:19715-19722.

Cavalheiro MG, Costa LS, Campos HS et al. (2016). Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. *An. Acad. Bras. Cienc.* 88, 1485–1499.

Ciriolo MR., Palamara AT, Incerpi S et al. (1997). Loss of GSH, oxidative stress, and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection. *J. Biol. Chem.* 272, 2700–2708.

CDC. Syndrome definitions for diseases associated with critical bioterrorism-associated agents. 2003 [cited 2011 December 12]; Disponível em <<http://www.cdc.gov/epo/dphsi/syndromic/framework.htm>>. Acesso em: 27 out. 2017.

Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*; 59(3):527-605.

Chien-Yun H, Li-Jen L, Shung-Te K et al. (2015). Glycyrrhizin, silymarin, and ursodeoxycholic acid regulate a common hepatoprotective pathway in HepG2 cells. *Phytomedicine* 22, 768–777.

Choi J, Ou JH (2006). Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G847-G851.

Claus C, Schönefeld K, Hübner D et al. (2013). Activity Increase in Respiratory Chain Complexes by Rubella Virus with Marginal Induction of Oxidative Stress. Volume 87 Number 15 *Journal of Virology* p. 8481–8492.

Coaccioli S, Crapa G, Fantera M et al. (2010). Oxidant/antioxidant status in patients with chronic HIV infection. *Clin Ter* 161:55-58.

Coimbra TLM, Santos CL, Suzuki A et al. (2007). Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 49(4):221-224, July-August.

Costa KB. (2014). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde – CIPq-saúde. Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciência Fisiológicas. Laboratório de Biologia Celular e Molecular.

- Crocenzi FA & Roma MG. (2006). Silymarin as a new hepatoprotective agent in experimental cholestasis: new possibilities for an ancient medication. *Curr Med Chem*, v.13, n.9, p.1055-1074.
- Cruz ACR, Vasconcelos PFC. (2008). Palestra: Arbovírus no Brasil. *Biológico*, São Paulo, v.70, n.2, p.45-46, jul./dez.
- Cutler RG. (1984). In: Johnson JE Jr (ed) *Aging and cell function*. Plenum Press, New York, pp 1–148.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R et al. (2006). Biomarkers of oxidative stress in human disease. *Clin. Chem.* 52, 601–623.
- Darvesh AS & Bishayee A. (2010). Selenium in the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 10:338-345.
- De Figueiredo ML & Figueiredo LT. (2014). Emerging alphaviruses in the Americas: chikungunya and Mayaro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47(6), 677–683.
- De Figueiredo RM, Thatcher BD, de Lima ML et al. (2004). Exanthematous diseases and the first epidemic of dengue to occur in Manaus, Amazonas state, Brazil, during 1998–1999. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37(6), 476–479.
- Deneke SM & Fanburg BL. (1989). Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*; 257: L163±L173.
- De Thoisy b, Gardon J, Salas RA et al. (2003). Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerg. Infect. Dis.* 9(10), 1326–1329.
- Devaux CA (2012). Emerging and re-emerging viruses: A global challenge illustrated by Chikungunya virus outbreaks. *World J Virol*, 12; v. 1, p. 11-22.
- Dhanwani R, Khan M, Alam SI et al. (2011). Differential proteome analysis of Chikungunya virusinfected new-born mice tissues reveal implication of stress, inflammatory and apoptotic pathways in disease pathogenesis. *Proteomics*, 11, 1936–1951.
- Dhanwani R, Khan M, Bhaskar AS et al. (2012). Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SHSY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. *Virus Res.* 163, 563–572.
- Domingo E & Holland JJ. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In *Evolutionary Biology of Viruses*; Morse, S.S., Ed.; Raven Press: New York, NY, USA; pp.161–184.
- Donalisio MR, Freitas ARR, Von Zuben APB. (2017). Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Rev Saude Publica.* 51:30.
- Drake JW & Holland JJ. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 13910–13913
- Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*

82, 47–95.

Dröge W, Eck HP, Mihm S. (1994). Oxidant-antioxidant status in human immunodeficiency virus infection. *Methods Enzymol*, v. 233, p. 594-601.

Dusting GJ & Macdonald PS. (1995). *Ann. Med.* 27, 395.

Esposito DL, Fonseca BA. (2017). Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Braz J Infect Dis.* 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>.

Evans MD, Church DF, Pryor WA. (1991). Aqueous cigarette tar extracts damage human a-1-proteinase inhibitor. *Chem Biol Interact*; 79: 151±164.

Fang YZ, Yang S, Wu G. (2002). Free radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition.* 18: 872-879.

Federico A, Dallio M, Loguercio C. (2017). Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules* 2017, 22, 191; doi:10.3390/molecules22020191.

Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C et al. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol.* 1997; 273:G7–G17.

Figueiredo LTM. (2007). Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 224-229.

Figueiredo LTM, Nogueira RM, Cavalcanti SM et al. (1989). Study of two different enzyme immunoassays for the detection of Mayaro virus antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84(3): 303-307.

Figueiredo LTM. (2015). The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(3): 233-234.

Figura 1: ciclo biológico dos arbovírus: adaptado de <http://www.microbeworld.org>. Acesso dia 25/10/2016.

Foppoli C, DeMarco F, Cini C et al. (2015). Redox control of viral carcinogenesis: the human papillomavirus paradigm. *Biochim. Biophys. Acta.* 1850, 1622–1632

Forman HJ. (2007). Use and abuse of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in studies of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 42:926–932.

Forman HJ & Dickinson DA. (2004). Introduction to serial reviews on 4-hydroxy-2-nonenal as a signaling molecule. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 594–596.

Forshey BM, Guevara C, Laguna-Torres VA et al. (2010). Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western South America, 2000–2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(8), e787.

- Gatti G & Perucca E. (1994). Plasma concentrations of free and conjugated silybin after oral intake of a silybin-phosphatidylcholine complex (silipide) in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 32, 614–617.
- Garcia-Ruiz C & Fernández-Checa JC. (2006). Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol.* 21:S3–6.
- Gil L, Martínez G, Tápanes R et al. (2004). Oxidative stress in adult dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 71:652-657.
- Global vector control response 2017–2030. (2017). Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM et al. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine* 87; 84–97.
- Gohil K, Viguie C, Stanley WC et al. (1988). Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol*; 64(1):115-9.
- Gould E.A, Coutard B, Malet H et al. (2010). Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Research* 87. 111–124.
- Gould E, Pettersson J, Higgs S et al. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health* 4. 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>.
- Griffith OW. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* Jul 15;106(1):207-12.
- Gubler DJ. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33(4): 330-342.
- Gullberg RC, Jordan Steel J, Moon SL et al. (2015). Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology* 475(2015)219–229.
- Guerra AN, Gavala ML, Chung HS et al. (2007). Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signal.* Mar;3(1-2):39-51.
- Ha Hye-Lin, Shin Hye-Jun, Feitelson Mark et al. (2010). Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J Gastroenterol* December 28; 16(48): 6035-6043.
- Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*; 59: 1.609-23.
- Halliwell B & Cross CE. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 10):5–12.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.

- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*; 186: 1-85.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. 4th edn. Clarendon, Oxford.
- Halsey ES, Siles C, Guevara C et al. (2013). Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 19(11), 1839–1842.
- Hassing RJ, Leparac-Goffart I, Blank SN et al. (2010). Imported Mayaro virus infection in The Netherlands. *J. Infect.* 61(4), 343–345.
- Heffner JE & Repine JE. (1989). Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 531–554.
- Henning KJ. (2004). What is syndromic surveillance? *Morb Mortal Weekly Rep Suppl*;53:7–11.
- Heraud JM, Hommel D, Hulin A et al. (1999). First case of yellow fever in French Guiana since 1902. *Emerg. Infect. Dis.* 5(3), 429–432.
- Higgs MR, Chouteau P, Lerat H. (2014). ‘Liver let die’: oxidative DNA damage and hepatotropic viruses. *Journal of General Virology* 95, 991–1004.
- Hill-Cawthorne, GA & Sorrella TC (2016). Future directions for public health research in emerging infectious diseases. *Public Health Research & Practice*, December, Vol. 26(5):e2651655. doi: <http://dx.doi.org/10.17061/phrp2651655>.
- Huang SH, Cao XJ, Liu W et al (2010) Inhibitory effect of melatonin on lung oxidative stress induced by respiratory syncytial virus infection in mice. *J Pineal Res* Mar;48(2):109-16. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00733.x. Epub Jan 8.-116.
- Huang J, Liu S, Li Z et al. (2017). Effect of lamivudine and silymarin on liver fibrosis-relevant factors in HBV transgenic mice with alcohol drinking. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* Mar 28;42(3):257-263. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2017.03.004.
- Hosakote YM, Liu T, Castro SM et al. (2009). Respiratory Syncytial Virus Induces Oxidative Stress by Modulating Antioxidant Enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.41,p. 348–357.
- Hosakote YM, Jantzi PD, Esham DL et al. (2011). Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.*, v. 183, p. 1550-1560.
- Hotez PJ, Murray KO. (2017). Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika - and now Mayaro? *PLoS Negl Trop Dis* 11(8): e0005462. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005462>.
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. (1992). Oxidised redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257:1496-1502.



Ignarro LJ. (1998). *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo.* 34 (C04), 3.

International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/>. Acesso dia: 20/10/2017.

Iranpour M, Moghadam AR, Yazdi M et al., (2016). Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Vol. 18; e1; 1 of 21.

Jacobson, MD (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* 21: 83–86.

Ji-Hua R, Xiang C, Li Z et al. (2016). Protective Role of Sirtuin3 (SIRT3) in Oxidative Stress Mediated by Hepatitis B Virus X Protein Expression. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0150961 March 7.

Jones DP. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid.Redox.Signal.* 8, 1865-79.

Jones KE, Patel NG, Levy MA et al. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451(February (7181):990–3.

Jordão JR, Chiarello PG, Bernardes MSM et al. (1998). Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31: 434-449.

Joseph PD, Mannervik B, Ortiz De Montellano P. (1997). *Molecular Toxicology*, 1st ed., Oxford University Press: New York, p.152-186.

Joubert PE, Werneke SW, de la Calle C et al. (2012). Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J. Exp. Med.* Vol. 209 No. 5 1029-1047.

Karabatsos N., *Medicine ASOT, Hygiene, Viruses ACOa-B.* (1985). International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses.

Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P et al. (2011). “Silymarin”, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 14, n. 4, p. 308.

Kaul P, Singh I, Turner RB (2002). Effect of rhinovirus challenge on antioxidant enzymes in respiratory epithelial cells. *Free Radic Res*; 36: 1085–1089.

Kielian M, Chatterjee PK, Gibbons DL et al. (2000). Specific roles for lipids in virus fusion and exit. Examples from the alphaviruses. *Subcell. Biochem* 2000;34:409–455.

King AMQ, Lefkowitz, E, Adams MJ et al. (2011). Family togaviridae. In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Science, CA, USA, 1103–1110.

Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. (1995). Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab. Invest.* 73, 3–19.

- Klassen P, Biesalski HK, Mazariegos M et al. (2004). Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. *Nutrition* 20:542-547.
- Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ et al. (2012). NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Med. (Berl)* 90, 1391–1406.
- Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R et al. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure–activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 12, 2601– 2623.
- Kovacic P & Jacintho JD. (2001). Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr. Med. Chem.*, 8, 773–796.
- Kuehl FJ & Egan RW. (1980). Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science*; 210:978-84.
- Kumar S, Misra UK, Kalita J et al. (2009). Imbalance in oxidant/antioxidant system in different brain regions of rat after the infection of Japanese encephalitis virus. *Neurochem. Int.* 55, 648–654.
- Kumar S & Pandey AK. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The ScientificWorld Journal*. Volume 2013, Article ID 162750, 16 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.
- Kuno G & Chang GJ. (2005). Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 608–637.
- Lani R, Hassandarvish P, Chiam CW et al. (2015). Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Scientific Reports* | 5:11421 | DOI: 10.1038/srep11421.
- Lenaz G. (2012). Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 93–136.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER et al. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346-57.
- Liang L, Hong-yang S, Wei L et al. (2017). Silymarin protects against acrylamide-induced neurotoxicity via Nrf2 signalling in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology* 102, 93e101.
- Lin KI, Pasinelli P, Brown RH et al. (1999). Decreased Intracellular Superoxide Levels Activate Sindbis Virus-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 19, Issue of May 7, pp. 13650–13655.
- Lino FG. (2012). Efeitos da silimarina e da silibina na patogênese da infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Liu CH, Lin CC, Hsu WC et al. (2016). Highly bioavailable silibinin nanoparticles inhibit HCV infection. *Gut*. 2017 Oct;66(10):1853-1861. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312019. Epub 2016 Jul 19.
- Liu T, Castro S, Brasier AR et al. (2004). Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation: role of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 279:2461-2469.
- Liu B, Chen Y, St Clair DK. (2008). ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic. Biol. Med.* 44:1529–1535.
- Long KC, Ziegler SA, Thangamani S et al. (2011). Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 85(4): 750-757.
- Machida K, Cheng KT, Lai CK et al. (2006). Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 80:7199-7207.
- Mahmood S, Kawanaka M, Kamei A et al (2004). Immunohistochemical evaluation of oxidative stress markers in chronic hepatitis C. *Antioxid Redox Signal* 6: 19-24.
- Mandell G, Benett J, Dolin R (2002). *Enfermedades infecciosas principios y prácticas*. Volumen 2. 5ta edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; p. 3500.
- Masters C, Pegg M, Crane D. (1986). On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol Cell Biochem* 70:113–120.
- Mastron JK, Siveen KS., Sethi G et al. (2015). Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review. *Anti-Cancer Drugs*, Vol 26 No 5.
- Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. (2016). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica* 166. 155–163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>.
- Meister A & Anderson ME. (1983). Glutathione. *Annual Reviews of Biochemistry*, 45:711-760.
- Middleton EJ. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 439, pp. 175–182.
- Ministério da Saúde, Portaria N°104, de 25 de Janeiro de 2011. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso dia 20/10/2015.
- Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Febre Mayaro. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro/20950-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em 18/10/2017.
- Mishra A, Kumar S, Pandey AK. (2013). Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 292934.
- Monath TP. (1988). Yellow Fever. In: *The Arboviruses: ecology and epidemiology*. Monath, T.P. (ed.), v. 5. CRC Press, Boca Raton, USA. p. 139-241.

- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109.
- Mota MTO, Ribeiro MR, Vedovello D et al. (2015). Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *Fut Virol.*10(9):1109–1122.117.
- Moreno-Solís G, de la Torre-Aguilar MJ, Torres-Borrego J et al (2015). Oxidative stress and inflammatory plasma biomarkers in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Clinical Respiratory Journal* ISSN 1752-6981.
- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*; 430:242–249.
- Mourão MP, Bastos Mde S, de Figueiredo RP et al. (2012). Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12(1): 42-46.
- Muñoz M & Navarro JC. (2012). Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica* 32:286-302.
- Nagem RA, Martins EA, Gonçalves VM et al. (1999). Crystalization and preliminar X-ray diffraction studies of human catalase. *Acta Crystallogr.DBiol.Crystallogr*55. 1614–1615.
- Nakashima I, Liu W, Akhand AA. (2003). 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *Mol. Aspects Med.* 24, 231–238.
- Nakatsue T, Katoh I, Nakamura S et al. (1998). 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* 253, 59–64.
- Napoleão-Pego P, Gomes LP, Provance-Jr DW et al. (2014). Mayaro Virus Disease. *J Hum Virol Retrovirol*, 1(3): 00018.
- Narayanan A, Popova T, Turell M et al. (2011). Alteration in superoxide dismutase 1 causes oxidative stress and p38 MAPK activation following RVFV infection. *PLoS One*, v. 6:e20354.
- Navarrete-Espinosa J & Gomez-Dantes H. (2006). Arbovirus causing hemorrhagic fever at IMSS. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 44(4), 347–353.
- Neel JV, Andrade AH, Brown GE et al. (1968). Further studies of the Xavante Indians. IX. Immunologic status with respect to various diseases and organisms. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 17: 486-498.
- Neumayr A, Gabriel M, Fritz J et al. (2012). Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, northern Peru. *Emerg Infect Dis* 18(4): 695-696.
- Pace GW & Leaf CD. (1995). The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radical Biol. & Med.* 19: 523–528.

- Pal S, Polyak SJ, Bano N et al. (2010). Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 25, p. 627- 634.
- Palamara AT, Perno CF, Ciriolo MR et al. (1995). Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *Antiviral Res.* 27, 237–253.
- Parge HE, Hallewell RA, Tainer JA. (1992). Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6109–6113.
- Pastor N, Weinstein H, Jamison E et al. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. *J. Mol. Biol.*, 304, 55–68.
- Pauvolid-Correa A, Juliano RS, Campos Z et al. (2015). Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 110(1): 125-133, February.
- Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED et al. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804. 245–262.
- Peterhans E. (1979). Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 383–392.
- Peterhans E. (1997a). Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation. *J Nutr*, v.127, p. 962S-965S.
- Peterhans E. (1997b). Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. *Biol Trace Elem Res*, v. 56, p.107-116.
- Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM et al. (1997). Genus specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcriptionpolymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 57(6):709-718.
- Pinheiro FP, Freitas RB, Travassos da Rosa JF et al. (1981). An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(3), 674–681.
- Pinheiro F.P. et al. (1986). 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, Vol. 1, 1986. p.375-408.
- Polyak SJ, Oberlies NH, Pécheur EI et al. (2013). Silymarin for HCV Infection. *Antivir Ther.* 18, 141–147.
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. (1995). Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, v.30, n.4, p.277-290.
- Powers AM, Aguilar PV, Chandler LJ et al. (2006). Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *Am J Trop Med Hyg* 75(3): 461-469.
- Pyne DB. (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med*;17:245-58.

- Rahman I, Biswas SK, Kode A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. Review. *European Journal of Pharmacology* 533. 222–239).
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V et al. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 189–207.
- Receveur MC, Grandadam M, Pistone T et al. (2010). Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil. *Euro Surveill* 15(18): pii 19563.
- Reshi ML, Su Yi-Che, Hong Jiann-Ruey. (2014). RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *International Journal of Cell Biology* Vol 2014, Article ID 467452, 16 pages.
- Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG et al. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 13147–13152.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE et al. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179:588-590.
- Sangeetha N, Aranganathan S, Nalini N. (2010). Silibinin ameliorates oxidative stress induced aberrant crypt foci and lipid peroxidation in 1, 2 dimethylhydrazine induced rat colon cancer. *Invest New Drugs*, v.28, n.3, p.225-233. 2010.
- Schaeffer M, Gajdusek DC, Lema AB et al. (1959). Epidemic jungle fevers among okinawan colonists in the Bolivian rain forest. I. *Epidemiology. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8, 372–396.
- Schmaljohn AL & McClain D. (1996). Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae). *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 54.
- Schwarz KB. (1996). Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med*, v. 21, p.641-649.
- Seet RC, Lee CY, Lim EC et al. (2009). Oxidative damage in dengue fever. *Free Radic Biol Med* 47:375-380.
- Sen S, Kawahara B, Chaudhuri G. (2012). 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. *FreeRadic.Biol.Med.*53. 1541–1551.
- Shope RE. (1980). Medical significance of togaviruses: an overview of diseases caused by togaviruses in man and in domestic and wild vertebrate animals. In *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. R.W. Schlesinger, Ed.: 47– 82. Academic Press Inc. New York, London, Sydney.
- Sies H. (1999). Glutathione and its cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27:916-921.
- Sies H, Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17;311(1152):617-31.

- Sies H & Moss KM. (1978). A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur J Biochem*, v.84, n.2, p.377-383.
- Silva M. (2011). 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.
- Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K et al. (2009). Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(3):e389. doi: 10.1371/journal.pntd.0000389. Epub 2009 Mar 10
- Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA et al. (1986). Intracellular localization of the copper–zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab. Invest*. 55, 363–371.
- Stehbens WE. (2004). Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Exp Mol Pathol* 77:121-132.
- Stowe DF & Camara AKS. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid. Redox Signal*. 11, 1373–1414.
- Strauss JH & Strauss EG. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 58, 491–562.
- Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. (2012). Arthritogenic alphaviruses - an overview. *Nat Rev Rheumatol*. May.
- Sumida Y, Nakashima T, Yoh T et al (2000). Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 33: 616-622.
- Taylor SF, Patel PR, Herold TJ. (2005). Recurrent arthralgias in a patient with previous Mayaro fever infection. *South Med J* 98(4): 484-485.
- Tesh RB, Watts DM, Russell KL et al. (1999). Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clin. Infect. Dis*. 28(1), 67–73.
- Theilacker C, Held J, Allering L et al. (2013). Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. *BMC Infect. Dis*. 13, 369.
- Tian Y, Jiang W, Gao N et al. (2010). Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 397, 420–424.
- Torres JR, Russell KL, Vasquez C et al. (2004). Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. *Emerg Infect Dis* 10(7): 1304-1306.
- Travassos Da Rosa APA et al. (1986). Arboviroses: Aspectos virológicos. In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, p.365-373.
- Travassos Da Rosa APA. et al. (1997). Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico. Leão, R. N. Q. (ed). Belém: editora CEJUP Press, p. 208- 225.

- Tsang CK, Liu Y, Thomas J et al. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat. Commun.* 5, 3446.
- Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mut. Res.*, v.195, p.137-149.
- Valko M, Morris H, Mazúr M et al. (2001). Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim. Biophys. Acta*, 1527, 161–166.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12.1161–1208.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J et al. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1–40.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84. doi:10.1016/j.biocel. 2006.07.001.
- Vasconcelos HB, Azevedo RS, Casseb SM et al. (2009). Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol*, 44(2):129–33.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF et al. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 5, 1323-1338.
- Vasconcelos PFC et al. (1998). Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: *An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries*. Travassos da Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C, Travassos da Rosa, J.F.S. (eds.). Belém: Instituto Evandro Chagas, p. 72-99.
- Vasilakis N & Tesh RB. (2015). Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Current Opinion in Virology*, 15, 69–74. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.007>.
- Vieira CJ, Silva DJ, Barreto ES et al. (2015). Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. *Acta Trop*;147:12e6.
- Wahlberg JM, Boere WA, Garoff H. (1989). The heterodimeric association between the membrane proteins of Semliki Forest virus changes its sensitivity to low pH during virus maturation. *J Virol*. Dec;63(12):4991-7.
- Wagoner J, Morishima C, Graf TN et al. (2010). Multiple effects of Silymarin on the Hepatitis C virus life cycle. *Hepatology*. 51, 1912–1921.
- Wang T & Weinman SA. (2006). Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 21:S34-37.
- Wang J, Chen Y, Gao N et al. (2013). Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice. *Plos One*, v.8, pp e55407.



Weaver SC, Ferro C, Barrera R et al. (2004). Venezuelan equine encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 141–174.

Weaver SC. (2006). Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 299, 285–314.

Weaver SC & Reisen WK. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 85(2), 328–345.

Wellington K & Jarvis B. (2001). Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*, v.15, n.7, p.465-489.

Williams VM, Filippova M, Soto U et al. (2011). HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 6:45–57.

Williams VM, Filippova M, Filippov V et al. (2014). Human Papillomavirus Type 16 E6\* Induces Oxidative Stress and DNA Damage. June, Volume 88 Number 12 *Journal of Virology* p. 6751–6761.

World Health Organization (1985).

World Health Organization (2017). *Global vector control response 2017–2030*. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wu D & Yotnda P. (2011). Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers., *J. Visualized. Exp* 57. 3357.

Yoshinaka Y, Takahashi Y, Nakamura S et al. (1999). Induction of Manganese-Superoxide Dismutase in MRC-5 Cells Persistently Infected with an Alphavirus, Sindbis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261, 139–143.

Zacks MA, Paessler S (2010). Encephalitic alphaviruses. *VetMicrobiol.* 140(3–4):281–286.77.

Zakaryan H, Arabyan E, Oo A et al. (2017). Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of Virology*, p. 1-13, 2017.

Zhang Y, Wanga Z, Chen H et al. (2014). Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. *International Journal of Infectious Diseases* 24, 30–36.

Zuchi N, Heinen, LB, Dos Santos MA et al. (2014). Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, central-west Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109(6), 820–823.