



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



Avaliação dos efeitos dos antioxidantes Silimarina, N-acetilcisteína, Fulerol, Quercetina e Rutina na produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” após a infecção pelo *Mayaro virus (Togaviridae)* e na multiplicação viral

LETICIA MARIA SILVA

ORIENTAÇÃO: PROF^a CINTIA LOPES DE BRITO MAGALHÃES

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

OURO PRETO

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Leticia Maria.

Avaliação dos efeitos dos antioxidantes Silimarina, N-acetilcisteína, Fulerol, Quercetina e Rutina na produção de "Espécies Reativas de Oxigênio" após a infecção pelo Mayaro virus (Togaviridae) e na multiplicação viral. [manuscrito] / Leticia Maria Silva. - 2022.
61 f.: il.: color., gráf., tab..

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

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Alphavirus. 2. Antioxidantes. 3. Silimarina. I. Magalhães, Cíntia Lopes de Brito. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.2

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Letícia Maria Silva

Avaliação dos efeitos dos antioxidantes silimarina, N-aceilcisteína, fulerol, quercetina e rutina na produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” após a infecção pelo Mayaro virus (Togaviridae) e na multiplicação viral

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

Aprovada em 21 de fevereiro de 2022

Membros da banca

Dra Cintia Lopes de Brito Magalhães - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr José Carlos de Magalhães - Membro titular externo (Universidade Federal de São João Del Rey)
Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara - Membro titular interno (Universidade Federal de Ouro Preto)

Cintia Lopes de Brito Magalhães, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 28/06/2022



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Lopes de Brito Magalhaes, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 28/06/2022, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0353135** e o código CRC **06A3BD6F**.

SERVIAM!

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as graças e bênçãos imerecidas. À Nossa Senhora, meu fiel Anjo da Guarda e todos os Santos do céu! Eu sou pequena e peço a ajuda de Cristo para conseguir ser fiel na fé, até o fim, e cumprir o meu dever.

À minha mãe Maria Edina, que é um verdadeiro sol e ilumina todos que estão ao seu redor, por todo apoio incondicional, e que acima de tudo me ensinou a amar e servir ao próximo com seu exemplo de vida e dedicação. Deus tomou para si como mãe a mulher mais incrível que já existiu em toda história da humanidade, Maria Santíssima. Como Pai misericordioso, ele então preparou outra, que também busca traçar o mesmo caminho de santidade, e a me deu de presente.

À minha irmã Ana Luisa, alma que me alegra todos os dias e me ensina a ser mais leve. És minha grande amiga, que sempre me ouve com caridade e amor. Obrigada por todo apoio incondicional.

À Professora Cintia Lopes de Brito Magalhães pela oportunidade e orientação durante a execução deste trabalho de pesquisa.

Aos colegas do grupo de pesquisa da Professora Cintia Magalhães, que me auxiliaram na execução deste trabalho, bem como todos os colegas do LBTM, equipe firmemente presente em anos tão desafiadores como foram os dois últimos.

À Universidade Federal de Ouro Preto por propiciar essa oportunidade e ao Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, e seus professores, por fazerem parte da minha formação.

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

RESUMO

O *Mayaro virus* (MAYV) é um arbovírus responsável pela Febre Mayaro, uma doença aguda autolimitada, que em alguns casos pode se estender com um quadro de artrite e artralgia debilitante. Apesar de há muito conhecido, pouco se sabe sobre os aspectos relacionados à infecção e patogênese do MAYV. A fim de mitigar essa ausência de conhecimento, nosso grupo demonstrou que a infecção de células pelo MAYV culmina com maior produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) e consequente estresse oxidativo. Ainda, em modelo animal, observamos que estresse oxidativo está presente na patologia hepática desencadeada pelo vírus. As ERO desempenham papel importante na fisiologia da célula e na defesa contra patógenos invasores, mas quando em excesso podem causar danos aos constituintes celulares, levando ao desequilíbrio redox, que numa infecção viral pode contribuir para a patogênese. Assim, considerando que o aumento de ERO e o estresse oxidativo são eventos conspícuos na infecção pelo MAYV, avaliamos o efeito da Silimarina, um fitoterápico antioxidante bem conhecido, na infecção *in vitro* e *in vivo* pelo MAYV. Além de inibir a produção de ERO e o estresse oxidativo desencadeados pela infecção, a Silimarina apresentou notável efeito antiviral. Dessa forma, os resultados obtidos com Silimarina na infecção pelo MAYV nos levaram a questionar se a ação antioxidante desse composto estaria diretamente relacionada à sua ação antiviral, ou seja, se inibindo a produção de ERO, qualquer composto antioxidante poderia inibir a multiplicação do MAYV. Para responder essa pergunta, no presente trabalho, em células Vero infectadas com o MAYV e tratadas com diferentes antioxidantes (Silimarina, N-acetilcisteína, Fulerol, Quercetina e Rutina), avaliamos a produção de ERO, a atividade antiviral global e a produção de partículas virais infecciosas, em diferentes tempos. Todos os antioxidantes testados inibiram a produção de ERO após a infecção 15 e 24 horas. Entretanto, as células infectadas e tratadas com N-acetilcisteína, Fulerol, Quercetina e Rutina, a multiplicação do MAYV não foi inibida 48 horas pós-infecção (hpi), demonstrando apenas uma ação antioxidante destes compostos. Somente a Silimarina foi capaz inibir as ERO e a multiplicação do vírus, 24 e 48 hpi, confirmando suas ações já demonstradas. Estes resultados sugerem que a multiplicação do MAYV em células Vero não sofre interferência direta das ERO, uma vez que reduzindo essas espécies através do tratamento com antioxidantes (exceto a Silimarina) a produção de partículas infecciosas não foi inibida, e também abre novas perspectivas para melhor caracterizar o mecanismo anti-MAYV da Silimarina.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) is an arbovirus responsible for Mayaro Fever, an acute self-limiting disease, which in some cases can extend to a condition of debilitating arthritis and arthralgia. Despite being known for a long time, little is known about the aspects related to the infection and pathogenesis of MAYV. In order to mitigate this lack of knowledge, our group demonstrated that the infection of cells by MAYV culminates in a greater production of "Reactive Oxygen Species" (ROS) and consequent oxidative stress. Also, in an animal model, we observed that oxidative stress is present in the liver pathology triggered by the virus. ROS plays an important role in cell physiology and in the defense against invading pathogens, but when in excess it can cause damage to cellular constituents, leading to redox imbalance, which in a viral infection can contribute to pathogenesis. Thus, considering that ROS increase and oxidative stress are conspicuous events in MAYV infection, we evaluated the effect of Silymarin, a well-known antioxidant herbal medicine, on *in vitro* and *in vivo* MAYV infection. In addition to inhibiting the production of ROS and the oxidative stress triggered by the infection, Silymarin had a remarkable antiviral effect. Consequently, the results obtained with Silymarin in MAYV infection led us to question whether the antioxidant action of this compound would be directly related to its antiviral action, that is, if by inhibiting the production of ROS, any antioxidant compound could inhibit the multiplication of MAYV. To answer this question in this present work, on Vero cells infected with MAYV and treated with different antioxidants (Silymarin, N-acetylcysteine, Fullerol, Quercetin and Rutin), we evaluated the production of ROS, the global antiviral activity and the production of infectious viral particles at different times. All tested antioxidants inhibited ROS production after 15 and 24 hours of infection. However, in cells infected and treated with N-acetylcysteine, Fullerol, Quercetin and Rutin, the multiplication of MAYV was not inhibited 48 hours post-infection (hpi), demonstrating only an antioxidant action of these compounds. Only silymarin was able to inhibit ROS and virus multiplication at 24 and 48 hpi, confirming its already demonstrated antiviral actions. These results suggest that the multiplication of MAYV in Vero cells does not suffer direct interference from ROS, since reducing these species through treatment with antioxidants (except for Silymarin), the production of infectious particles was not inhibited, and opens new perspectives to better characterize the disease. Silymarin's anti-MAYV mechanism.

LISTA DE ABREVIATURAS

Å – Angstrom

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CAT – Catalase

CHIVK – Vírus Chikungunya

DENV – Vírus da Dengue

DMEM - Meio Dulbecco's Modified Eagle

ECP – Efeito citopático

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

FNP – Fulerol

GSSG – Glutationa oxidase

GSH – Glutationa reduzida

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

MAYV – Vírus Mayaro

MDA – Malondialdeído

MOI – Multiplicidade de Infecção

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina

NAC – N-acetilcisteína

NADPH – Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Fosfato

OROV – Vírus Oropouche

RNA – Ácido ribonucléico

ROCV – Vírus Rocio

SOD – Superóxido dismutase

SeV – Vírus Sendai

UFP – Unidade Formadora de Placa

YFV – Vírus da Febre Amarela

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de transmissão do MAYV.....	7
Figura 2 – Estrutura geral do MAYV determinada por microscopia crioeletrônica.....	8
Figura 3: Representação da organização das proteínas do genoma do MAYV.....	9
Figura 4 – Relação entre enzimas antioxidantes.....	14
Figura 5 – Estruturas e nomenclatura dos compostos encontrados na Silimarina.....	17
Figura 6 – Estrutura da N-acetilcisteína.....	19
Figura 7 – Estrutura da Quercetina.....	22
Figura 8 – Estrutura da Rutina.....	24
Figura 9 – Efeito do tratamento com antioxidantes na produção de ERO em células Vero infectadas pelo MAYV.....	33
Figura 10 – Ensaio de viabilidade em células Vero infectadas com MAYV e tratadas com diferentes antioxidantes.....	35
Figura 11 – Título de MAYV em células Vero tratadas com diferentes compostos após 24 e 48 horas pós-infecção (hpi).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Oxidantes endógenos principais.....	12
---	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 ARBOVÍRUS.....	3
2.2 FAMÍLIA <i>TOGAVIRIDAE</i> , GÊNERO <i>ALPHAVIRUS</i>	4
2.3 <i>MAYARO VIRUS</i>	5
2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	11
2.5 SILIMARINA.....	16
2.6 N-ACETILCISTEÍNA (NAC).....	18
2.7 FULEROL.....	20
2.8 QUERCETINA.....	21
2.9 RUTINA.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 CÉLULAS, VÍRUS E COMPOSTOS.....	27
4.1.1 Células.....	27
4.1.2 Origem do vírus, produção do estoque trabalho e titulação.....	27
4.1.3 Compostos.....	28
4.2 DOSAGEM DAS “ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO” (ERO).....	29
4.3 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL GLOBAL PELO MTT.....	30
4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VÍRUS POR TITULAÇÃO.....	31
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 PRODUÇÃO DE ERO EM CÉLULAS VERO INFECTADAS COM MAYV E TRATADAS COM OS ANTIOXIDANTES.....	32
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL GLOBAL DA SILIMARINA, NAC, FULEROL, QUERCETINA E RUTINA CONTRA O MAYV.....	34
5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VÍRUS EM CÉLULAS INFECTADAS COM MAYV E TRATADAS COM OS ANTIOXIDANTES SILIMARINA, NAC, FULEROL, QUERCETINA E RUTINA.....	35
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXOS.....	60

1. INTRODUÇÃO

Desde seu primeiro isolamento em 1954 em Trinidad e Tobago (ANDERSON, 1957), casos humanos de infecção pelo *Mayaro virus* (MAYV) vem sendo relatados na América Central e na América do Sul, principalmente nas regiões ao redor da bacia amazônica (PAHO, 2019). A infecção pelo MAYV em humanos é relatada principalmente em áreas rurais, com poucos casos relatados exportados para áreas urbanas. No entanto, dados os surtos urbanos mais recentes de infecções por arbovírus emergentes, como Dengue, Zika e Chikungunya, é importante monitorar cuidadosamente a evolução do MAYV, implementando lições aprendidas com surtos anteriores para evitar mais problemas de Saúde Pública (ACOSTA AMPUDIA, 2018).

O quadro clínico da Febre Mayaro é quase indistinguível das outras arboviroses. Os principais sintomas são febre, cefaleia, mialgia, náuseas, vômitos, diarreia e erupção cutânea, com duração de 3 a 5 dias, sendo que parte dos pacientes afetados desenvolvem poliartalgias e artrites persistentes por meses ou até anos, os quais podem causar deficiência incapacitante (Assunção-Miranda; Cruz-Oliveira; Da Poian, 2013; Vieira et al., 2015). Portanto, devido à sua relevância epidemiológica e para a Saúde Pública, estudos que visem melhor compreender os eventos que contribuem para a patogênese da Febre Mayaro e as formas de controle e tratamento são de extrema importância.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que em cultura de células e em modelo animal, a infecção pelo MAYV acarreta uma desregulação na homeostase redox, com aumento na produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) e/ou uma redução no sistema de defesa antioxidante, culminando com o estresse oxidativo, que pode contribuir com a patogênese do vírus (JONES, 2006; CAMINI et al., 2017a; CAETANO et al., 2019). Ainda, uma vez demonstrado que o estresse oxidativo é um evento conspícuo na infecção pelo MAYV, avaliamos a capacidade da Silimarina (potente antioxidante natural) em reverter os danos oxidativos acarretados pela infecção. Assim, verificamos *in vitro* que, além de diminuir a produção de ERO e o estresse oxidativo desencadeados pelo MAYV, a Silimarina também apresentou significativa atividade antiviral (CAMINI et al., 2018), chamando atenção para seu potencial como abordagem farmacológica.

Prosseguindo esses estudos, os efeitos antioxidantes e anti-MAYV nos levaram a investigar se a Silimarina também poderia reduzir o estresse oxidativo e a multiplicação do

MAYV após a infecção em um modelo animal imunocompetente. Nós demonstramos que camundongos BALB/c infectados apresentaram menor ganho de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, leucopenia, aumento das transaminases hepáticas, aumento das citocinas pró-inflamatórias, inflamação hepática, aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo e redução da atividade das enzimas antioxidantes. No entanto, em animais infectados e tratados com Silimarina, todos esses parâmetros foram significativamente melhorados, e a detecção de carga viral no fígado, baço, cérebro, músculo quadríceps e pata foi significativamente reduzida. Este trabalho reforçou os potentes efeitos hepatoprotetor, antioxidante, anti-inflamatório e antiviral da Silimarina contra a infecção por MAYV, demonstrando seu potencial contra Febre Mayaro (FERRAZ et al., 2021).

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

Assim, para melhor compreender o efeito das ERO na multiplicação do MAYV e se qualquer antioxidante poderia ter um efeito antiviral por inibição dessas espécies, avaliamos em células Vero infectadas com MAYV e tratadas com diferentes antioxidantes a produção de ERO bem como a atividade antiviral desses compostos. Assim, além da Silimarina, escolhemos alguns compostos cujas ações antioxidantes já são bem descritas na literatura: N-acetilcisteína (NAC), Fulerol, Quercetina e a Rutina (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008; HOLLMAN; HERTOOG; KATAK, 1996; HERTOOG, et al., 1993; PEREIRA et al., 2021). Todos os compostos aqui testados foram capazes de diminuir a produção de ERO após a infecção de células Vero pelo MAYV, 15 e 24 horas pós-infecção (hpi), confirmando seus efeitos antioxidantes. No entanto, apenas a Silimarina apresentou atividade antiviral contra o MAYV, 24 e 48 hpi, como já havia sido mostrado por estudos prévios do grupo (CAMINI et al., 2018; FERRAZ et al., 2021), enquanto os demais compostos não inibiram significativamente a produção de vírus nessas células.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho reforçam o potencial efeito antiviral e antioxidante da Silimarina na infecção pelo MAYV e indicam que a atividade antioxidante

da Silimarina não está diretamente ligada a ação antiviral, ou seja, a multiplicação de MAYV não parece ser diretamente influenciada por ERO, uma vez que somente inibindo essas espécies não há interferência na produção de novas partículas virais. No entanto, mais estudos devem ser realizados para melhor entender as ações da Silimarina na infecção pelo MAYV bem como outros possíveis efeitos benéficos dos demais antioxidantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ARBOVÍRUS

Os arbovírus (*arthropod-borne virus*) são vírus transmitidos ao homem pela picada de artrópodes hematófagos. São assim designados não somente pela sua veiculação através dos artrópodes, mas também pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer nesses (LOPES, 2014). A emergência de um arbovírus está relacionada a questões ecológicas (ambientais ou climáticas) que afetam seu nicho. O deslocamento geográfico de arbovírus também está relacionado à disseminação de reservatórios animais e/ou seus vetores artrópodes (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014).

As doenças arbovirais compartilham muitas características comuns, tornando-as difíceis de distinguir umas das outras. Devido a mudanças nos fatores antropogênicos e mutações virais, os arbovírus têm o potencial de surgir ou ressurgir nas Américas. Assim, para alocar recursos adequadamente e desenvolver intervenções para prevenir a disseminação de arbovírus, é importante fazer com que as doenças sejam discerníveis umas das outras (GANJIAN; RIVIERE-CINNAMOND, 2020).

Os arbovírus requerem um hospedeiro (geralmente um pássaro ou pequeno mamífero) no qual se multiplicam, e também um vetor, como um mosquito, para transmissão a outros organismos. Os mosquitos fêmeas ingerem o vírus do sangue de um animal infectado. Ao picar outro animal, o mosquito transfere o vírus através da saliva para o novo hospedeiro (WEAVER; BARRETT, 2004).

No Brasil, já foram isoladas mais de 210 espécies de arbovírus, com cerca de 40 que causam doenças esporádicas, endêmicas e/ou epidêmicas em humanos, responsáveis por

considerável morbidade e/ou mortalidade no país. A maioria pertence às famílias *Perybunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) e *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*). Alguns representantes dessas famílias são o *Oropouche virus* (OROV), *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV), *Yellow Fever virus* (YFV), *Rocio virus* (ROCV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Mayaro virus* (MAYV), que juntos têm sido responsáveis por mais de 95% dos casos humanos envolvendo arbovírus no Brasil (WEAVER, 2010; NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014; CHOUIN-CARNEIRO; DOS SANTOS, 2017).

2.2 FAMILIA TOGAVIRIDAE, GÊNERO ALPHAVIRUS

Alphavirus é um gênero da família *Togaviridae* que possui vírus de RNA de fita simples, de sentido positivo, geralmente transmitidos por mosquitos. Os alfavírus causadores de doença em humanos possuem dois padrões distintos, aqueles que causam encefalites e aqueles que geram artralgias incapacitantes nos pacientes. Os alfavírus artritogênicos compreendem o *Chikungunya virus* (CHIKV), *Ross River virus* (RRV), *Barmah Forest virus* (BFV), *O'nyong-nyong virus* (também conhecido como Igbo Ora), *Sindbis virus* (SDV) e *Mayaro virus* (MAYV) (SURBIER et al., 2012).

Vários fatores, combinados com mudanças na biologia dos vetores e adaptação viral, podem resultar em um aumento na prevalência e detecção das doenças reumáticas alfavirais. Em grandes aglomerações urbanas, há oportunidades crescentes de contágio viral. Os vírus se espalham rapidamente por grandes distâncias devido às viagens humanas em veículos velozes. Assim, os vírus podem viajar em passageiros infectados, especialmente indivíduos no período de incubação da doença. As migrações para áreas urbanas e o crescimento descontrolado das cidades também podem aumentar a disseminação de patógenos. Esses patógenos passam de um problema de saúde em área restrita a um problema mundial. Assim, uma compreensão mais ampla dessas doenças, diagnósticos diferenciais e formas de tratamento são necessários. Atualmente, as opções de tratamento para artrites alfa-virais são limitadas e frequentemente inadequadas (SURBIER et al., 2012).

Alguns arbovírus surgiram e atualmente estão produzindo epidemias. Exemplos desses incluem os vírus da Dengue (*Flavivirus*), Zika (*Flavivirus*) e Chikungunya (*Alphavirus*), (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). Infecções pelo vírus Chikungunya (CHIKV) vem sendo relatadas no Brasil desde Setembro de 2014 (NUNES et al., 2015) e casos de infecções

pelo vírus Zika vem sendo relatadas no Brasil desde Maio de 2015 (LOWE et al., 2018). Como o MAYV possui uma alta similaridade em relação ao CHIKV, a vigilância epidemiológica se faz necessária para que o aumento do número de casos de MAYV não ocorra no Brasil como aconteceu com o CHIKV (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014).

2.3 MAYARO VIRUS

O *Mayaro virus* (MAYV) foi isolado pela primeira vez em Trinidad e Tobago no ano de 1954 no sangue de trabalhadores rurais (ANDERSON, 1957). Desde então, casos foram relatados em outros países na América Central e na América do Sul, principalmente nas regiões ao redor da bacia amazônica (PAHO, 2019).

O primeiro surto de Febre de Mayaro no Brasil foi relatado em 1957, próximo ao rio Guama, no Estado do Pará, atingindo cerca de 100 pessoas. Neste surto, o MAYV foi isolado de seis pacientes. Levantamentos sorológicos realizados em 17 localidades da região amazônica mostraram uma soroprevalência de MAYV de 2% a 40,9% (CAUSEY et al., 1957). Em 1977 e 1978, a epidemia ocorrida em Belterra, Pará, Brasil, foi amplamente estudada. Mais de 9.000 insetos representando 26 espécies foram testados em 396 pools para a presença de arbovírus. A espécie de mosquito *Haemagogus janthinomys* produziram os únicos isolados do vírus MAYV. Esse mosquito é encontrado em abundância no dossel da floresta. Aproximadamente 12.000 vetores potenciais de picadas foram capturados em um aprisionamento de 1 mês que coincidiu com o pico da epidemia de MAYV. MAYV foi recuperado de *H. janthinomys*, *Limatus flavisetosus* e *Wyeomyia aporonoma*. Amostras combinadas de *H. janthinomys* produziram nove isolados de MAYV. A taxa mínima de infecção de campo de *H. janthinomys* foi de 1:82 para MAYV (HOCH et al., 1981). Apesar de endêmico na região amazônica do Brasil, casos de MAYV já foram observados em outros lugares. Além disso, os anticorpos MAYV foram detectados em populações humanas e animais na Bolívia, Brasil, Colômbia, Panamá, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Venezuela, Guiana Francesa e México, sugerindo aumento da disseminação viral (DOS SANTOS et al., 2014). Até o momento, nenhum estudo mostrou se os indivíduos infectados com MAYV podem ser assintomáticos (LIMA et al., 2021).

Alguns surtos de MAYV têm sido associados às estações chuvosa e de verão, quando os artrópodes se reproduzem e o vírus inicia seu ciclo entre o vetor viral e seu alvo. A

transmissão de MAYV ocorre quando mosquitos fêmeas pertencentes ao gênero *Haemagogus*, principalmente *Haemagogus janthinomys*, adquirem sangue de um hospedeiro infectado com altas quantidades de MAYV. Além de *Haemagogus*, o vírus já foi isolado de outros gêneros de mosquitos, incluindo *Culex*, *Mansonia*, *Aedes*, *Psorophora* e *Sabethes*. Assim que é ingerido, ele infecta as células epiteliais do intestino médio ou mesentério do mosquito. Então, o vírus se replica e migra para a lâmina basal para chegar à hemolinfa. Em seguida, invade as glândulas salivares, onde estabelece uma infecção persistente. O vírus é liberado pela saliva no sangue quando o mosquito pica um hospedeiro em potencial. O MAYV foi detectado na natureza em vários hospedeiros vertebrados, como primatas não humanos, roedores, pássaros, preguiças e outros pequenos mamíferos (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018).

Como mostra a Figura 1, semelhante ao ciclo de vida do vírus da Febre Amarela, acredita-se que a transmissão do MAYV para humanos ocorra no ciclo rural, no qual os mosquitos espalham o vírus para humanos que vivem próximos ou fazem uso frequente de habitats florestais. Até o momento, os casos humanos de Febre Mayaro ocorreram principalmente devido a esse contato íntimo com o ambiente silvestre (MACKAY; ARDEN, 2016; MOTA et al., 2015; GANJIAN; RIVIERE-CINNAMOND, 2020). Embora o principal mosquito vetor do MAYV tenha sido identificado (*Haemagogus* spp.), alguns estudos sugerem que *Aedes aegypti*, um importante vetor urbano, seria capaz de transmitir o vírus, chamando a atenção para o potencial estabelecimento de um ciclo urbano. Com isto, temos que estudos adicionais explorando a competência de outras espécies de mosquitos para transmitir o vírus são necessários (LONG et al., 2011; IZURIETA et al., 2018).

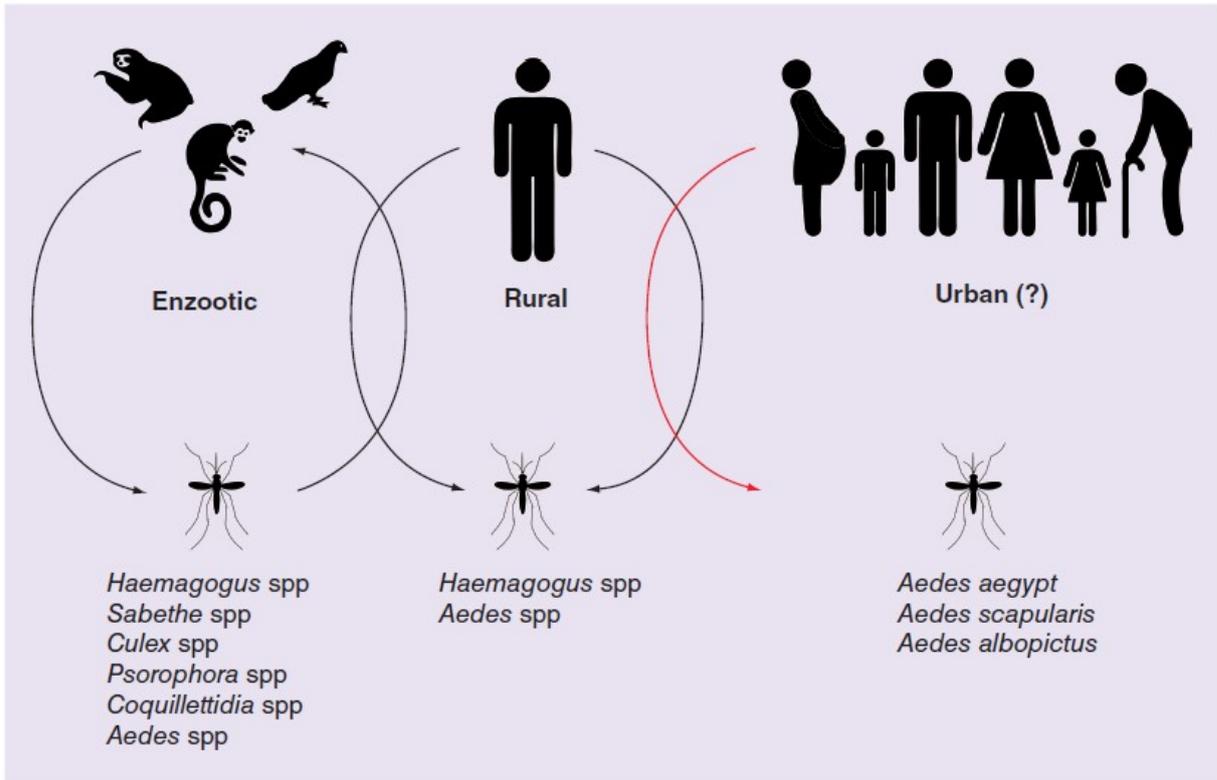


Figura 1: Ciclo de transmissão do MAYV. As setas pretas indicam os ciclos de ocorrência atual e a seta em vermelho um possível ciclo urbano. Fonte: Mota et al., 2015.

Em um estudo inovador recente, Ribeiro-Filho et al. (2021) descreveram a estrutura de partículas do MAYV maduro e infeccioso obtidas por microscopia crioelétrica (Cryo-EM) (Figura 2). Foi visto que MAYV possui características e organização típicas de alfavírus. A comparação da estrutura do MAYV com a do CHIKV revelou particularidades nas proteínas E1 e E2 que podem ser exploradas estrategicamente para fins terapêuticos e diagnósticos. A glicosilação do MAYV pode afetar a ligação ao receptor do hospedeiro MXRA8. Pesquisas inovadoras, gerando dados como este podem contribuir para uma maior compreensão da estrutura e biologia de alfavírus.

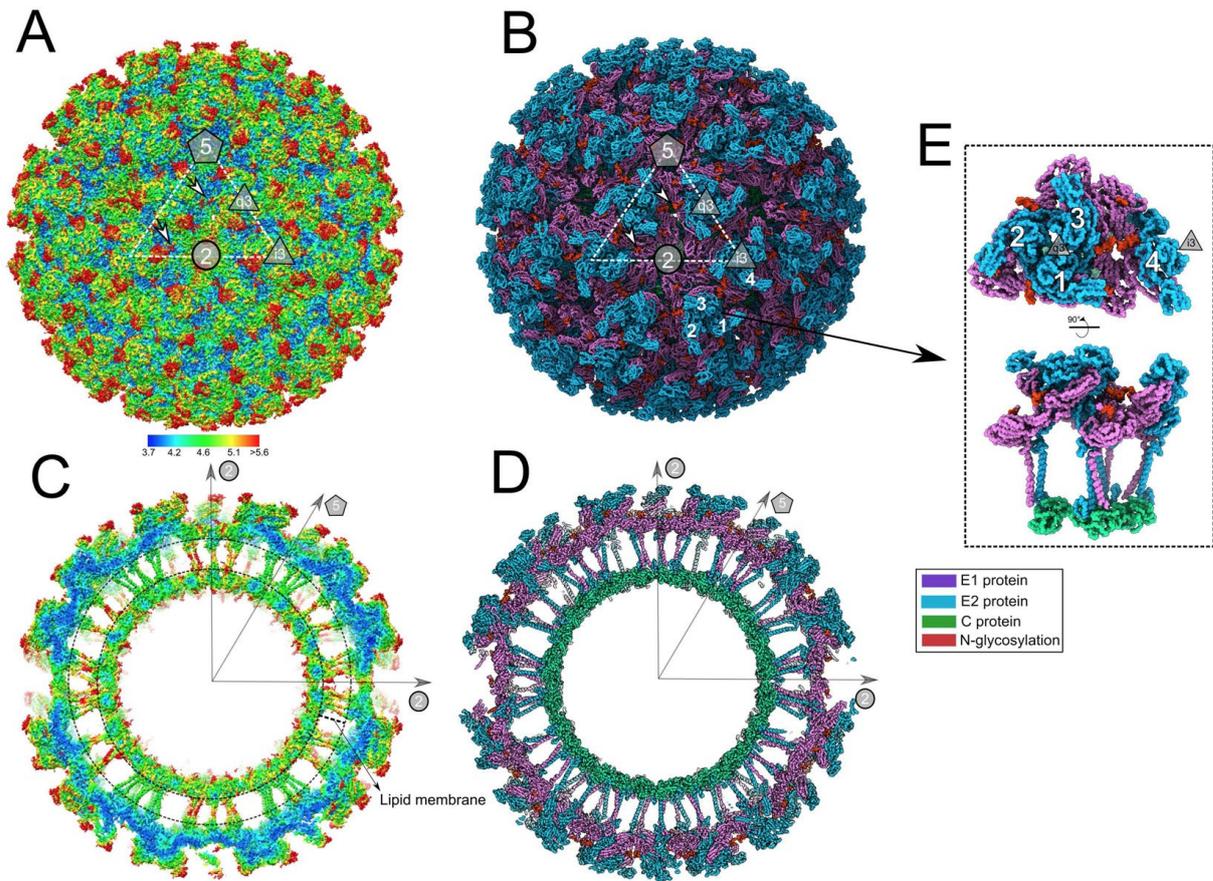


Figura 2: Estrutura geral do MAYV determinada por microscopia crioelétrica. A) O triângulo branco tracejado indica a unidade assimétrica icosaédrica. Os polígonos indicam o eixo quártuplo (pentágono), os eixos triplo e quase triplo (triângulos) e o eixo duplo (círculo). B) Modelo atômico do MAYV 3D ajustado ao mapa de densidade. C, D) Modelo atômico, respectivamente. E) Duas vistas giradas da unidade assimétrica MAYV formada por quatro heterodímeros E1–E2 seguindo a triangulação icosaédrica T=4.

O genoma do MAYV consiste em um RNA de fita simples senso positivo, de 11,5 kb de comprimento. O RNA viral é estruturado em duas estruturas de leitura aberta (ORFs), que são separadas por uma região intergênica (Figura 3). A primeira ORF abrange dois terços do RNA genômico, que pode ser lido diretamente como um mRNA para codificar as quatro proteínas não estruturais (nsP1–4) que são necessárias para a transcrição e replicação do RNA viral. As proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) são codificados por um RNA de fita positiva subgenômico referido como RNA 26S. O RNA 26S é transcrito de um RNA intermediário de fita negativa e é idêntico ao um terço do RNA genômico. São conservados repetidos elementos de sequência na extremidade 5' e 3' e na região intergênica

(NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014). Estudos filogenéticos anteriores usando um fragmento da estrutura de leitura aberta da poliproteína estrutural sugerem que o MAYV ocorre em 2 genótipos distintos, D e L. O genótipo D inclui isolados de todos os países onde o MAYV foi detectado e o genótipo L contém cepas detectadas apenas no Brasil (POWERS et al., 2006).

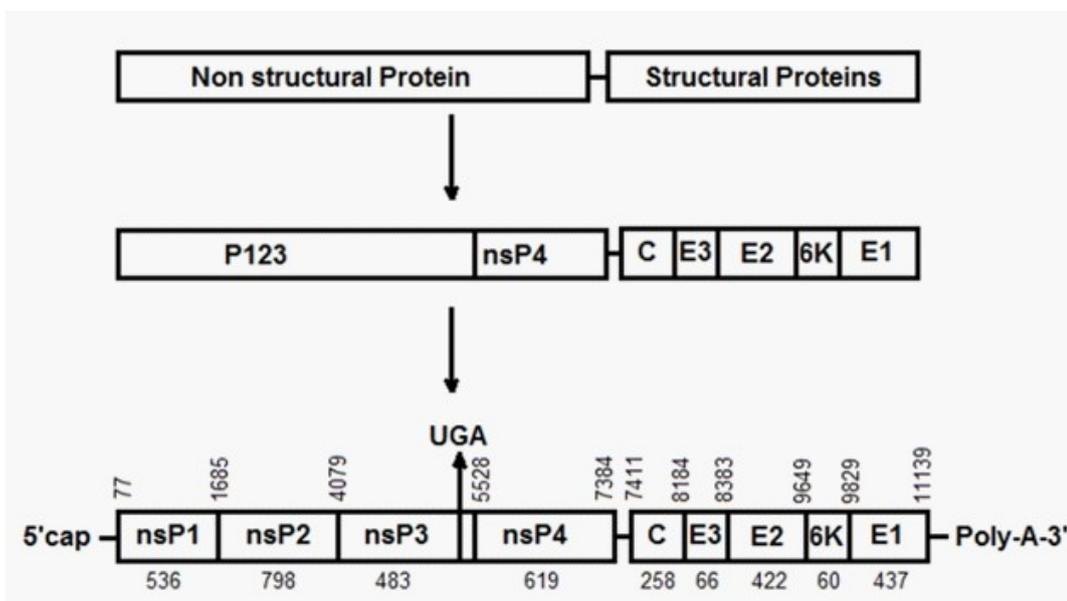


Figura 3: Representação da organização das proteínas do genoma do MAYV. Fonte: Napoleão-Pego et al., 2014.

Como dito anteriormente, a infecção por MAYV em humanos foi relatada principalmente em áreas rurais, e poucos desses casos foram exportados para áreas urbanas. No entanto, dados os surtos patogênicos mais recentes de ZIKV, DENV e CHIKV, é importante monitorar cuidadosamente a evolução do MAYV, implementando lições aprendidas com surtos anteriores de arbovírus para evitar mais problemas de Saúde Pública (ACOSTA AMPUDIA, 2018).

Em um estudo conduzido por Halsey et al. (2013), foram avaliadas 16 pessoas com infecção confirmada pelo MAYV na Amazônia peruana, para acompanhar prospectivamente os sintomas clínicos e a resposta sorológica ao longo de um período de 12 meses. A infecção pelo MAYV causou artralgia de longo prazo em mais da metade, semelhante a relatos de outros alfavírus artritogênicos. O estudo demonstrou que pessoas com febre aguda de Mayaro frequentemente apresentam muitos sintomas inespecíficos, mas podem continuar a ter dor crônica nas articulações por pelo menos 1 ano após a doença aguda. O estudo também foi

válido para a necessidade de considerar a infecção por MAYV em pacientes com artrite soronegativa (fator reumatóide negativo e anticorpos antinucleares) em regiões para as quais o MAYV é endêmico.

O desenvolvimento de vacinas ou medicamentos específicos depende de pesquisa, que muitas vezes depende de financiamento vindo do governo. Como atualmente não há esforços para detectar MAYV, há pouco incentivo para investir na pesquisa ao vírus. Isso alimenta um ciclo vicioso em que baixas taxas de detecção levam a poucos investimentos no estudo da doença (MOTA et al., 2015).

Nosso grupo de pesquisa tem somado para o grupo de pesquisadores que buscam entender mais sobre o MAYV. Em estudo recente anterior do grupo, realizado *in vitro*, Camini et al. (2017) demonstraram que em células HepG2 e J774, a infecção pelo MAYV culminou com maior produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO), aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo (malondialdeído e proteína carbonilada), diminuição da relação glutatona reduzida versus oxidada (GSH/GSSG) e aumento das defesas enzimáticas antioxidantes. Esse foi o primeiro estudo sobre o envolvimento do estresse oxidativo durante a infecção por MAYV.

Em seguida, em outro estudo realizado *in vivo*, Caetano et al. (2019) verificaram que camundongos infectados com MAYV desenvolveram perda de peso, altos níveis de viremia, carga viral no fígado, com desenvolvimento de uma resposta imune humoral específica. Nenhum dos camundongos infectados morreu; no entanto, a infecção por MAYV induziu danos ao fígado, conforme indicado pelo aumento nos níveis séricos de aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT) e pelo aumento significativo de células inflamatórias no parênquima hepático. Ainda, o MAYV induziu estresse oxidativo significativo no fígado de animais infectados, conforme indicado por um aumento dos níveis de malondialdenido, proteína carbonilada, atividade de mieloperoxidase (MPO) e diminuição na relação glutatona reduzida versus oxidada (GSH/GSSG). Ainda, a infecção diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) no fígado dos animais infectados. Assim, esse trabalho reforçou a hipótese que o desequilíbrio redox possa ser um importante fator que contribua com a infecção pelo MAYV.

Esses trabalhos ascenderam questões sobre uma possível abordagem terapêutica utilizando compostos antioxidantes na tentativa de modular o dano celular oxidativo associado ao MAYV. Assim, utilizando a Silimarina, um complexo de antioxidantes obtido da

erva *Silybum marianum*, verificamos suas ações antioxidantes e antivirais promissoras contra o MAYV *in vitro* e *in vivo* (CAMINI et al., 2018, FERRAZ et al., 2021). Os ensaios *in vitro* foram realizados em células HepG2 infectadas com o MAYV, onde observamos que o tratamento com a Silimarina foi capaz de inibir a produção exacerbada de ERO nas células infectadas, bem como diminuir os níveis de malondialdeído e proteína carbonilada. Ainda, através de ensaios de inibição do efeito citopático, inibição da multiplicação viral e redução de placa, verificamos uma promissora atividade antiviral da Silimarina contra o MAYV (CAMINI et al., 2018). Nos ensaios *in vivo*, nós demonstramos que camundongos infectados com MAYV apresentaram menor ganho de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, leucopenia, aumento sérico de AST/ALT, aumento de citocinas pró-inflamatórias, aumento de biomarcadores de dano oxidativo e redução das enzimas antioxidantes. Já nos animais infectados e tratados com a Silimarina, todos esses parâmetros foram semelhantes aos observados nos animais controles. Ainda, a Silimarina reduziu significativamente a carga viral no fígado, baço, cérebro, músculo quadríceps e pata, reforçando sua efetiva ação anti-MAYV (FERRAZ et al., 2021).

Coletivamente, os trabalhos do nosso grupo reforçam que a infecção pelo MAYV, seja *in vitro* ou *in vivo*, desencadeia uma alteração na homeostase redox, com aumento de ERO, desequilíbrio das defesas antioxidantes e estresse oxidativo, o que pode ser fator importante na patogênese viral, desde que, nessa condição, o excesso de reações ocasionadas pelas ERO pode gerar acúmulo de complexos citotóxicos com proteínas, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, oxidação de tiois, peróxidos lipídicos, entre outros, acarretando efeitos deletérios às funções celulares (HALLIWELL; CROSS, 1994; CAI; HARRISON, 2000).

2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio (O₂) é uma molécula essencial para todas as formas de vida aeróbia, principalmente para a célula obter energia como uma forma de ATP. Em condições normais ou patológicas, o O₂ é frequentemente transformado em formas altamente reativas, chamadas de “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) (GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006). As ERO são geradas deliberadamente por enzimas, como as NADPH oxidases (adenine

dinucleotide phosphate oxidase), ou como consequência do metabolismo celular da mitocôndria. As ERO desempenham diversos papéis na fisiologia e fisiopatologia, incluindo na sinalização celular, proliferação celular e apoptose. No entanto, quando a produção celular de ERO supera sua capacidade antioxidante, um estado de estresse oxidativo é atingido levando a lesões celulares que contribuem para a patogênese de várias doenças. Dependendo do nível de ERO, diferentes fatores de transcrição redox-sensíveis são ativados e coordenam respostas biológicas distintas. Um baixo estresse oxidativo induz Nrf2, um fator de transcrição implicado na ativação de genes que codificam enzimas antioxidantes. Uma quantidade intermediária de ERO desencadeia uma resposta inflamatória através da ativação de NF- κ B e AP-1, e um alto nível de estresse oxidativo induz a perturbação do poro de permeabilidade transitória mitocondrial e a interrupção da transferência de elétrons, resultando em apoptose ou necrose (GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006).

As ERO são produzidas a partir do O_2 como resultado do metabolismo celular normal. Como demonstrado na Tabela I, elas podem ser divididas em 2 grupos: radicais livres e não radicais. Moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados e, portanto, dando reatividade à molécula são chamadas de radicais livres. Quando dois radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados, formas não radicais são criadas. As três principais ERO que são de significância fisiológica são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em neutrófilos ativados, o H_2O_2 é consumido por mieloperoxidases (MPO). Na presença de íon cloreto, H_2O_2 é convertido em ácido hipocloroso (HOCl). Outros radicais livres derivados do oxigênio são os radicais peroxila ($ROO\cdot$). A forma mais simples desses radicais é o radical hidroperoxila ($HOO\cdot$) que tem um papel na peroxidação de ácidos graxos. Os radicais livres podem desencadear reações em cadeia de peroxidação lipídica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um carbono de metileno da cadeia lateral. O radical lipídico então reage com o oxigênio para produzir o radical peroxil. O radical peroxil inicia uma reação em cadeia e transforma ácidos graxos poli-insaturados em hidroperóxidos lipídicos (BIRBEN et al., 2012).

Tabela I: Oxidantes endógenos principais

Oxidant	Formula	Reaction Equation
Superoxide anion	$O_2^{\cdot-}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot-} + H^+$ $2O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Hydrogen peroxide	H_2O_2	$Hypoxanthine + H_2O + O_2 \rightleftharpoons xanthine + H_2O_2$ $Xanthine + H_2O + O_2 \rightleftharpoons uric\ acid + H_2O_2$
Hydroxyl radical	$\bullet OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$
Hypochlorous acid	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Peroxyl radicals	$ROO\bullet$	$R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet$
Hydroperoxyl radical	$HOO\cdot$	$O_2^{\cdot-} + H_2O \rightleftharpoons HOO\cdot + OH^-$

Fonte: Birben et al., 2012

Para que os organismos pudessem usar o O_2 em seu metabolismo sem acumular lesões aos constituintes celulares, ao longo da evolução, mecanismos antioxidantes foram desenvolvidos com a finalidade de prevenir, atrasar ou remover a oxidação das biomoléculas pelas ERO. Portanto, de modo geral, os prejuízos para os sistemas vivos decorrentes dessas espécies irão ocorrer quando houver um contexto de superprodução, com deficiência ou não das defesas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PAMPLONA; COSTANTINI, 2011).

O sistema antioxidante pode ser enzimático ou não-enzimático. O enzimático é composto pelas enzimas celulares Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). O não-enzimático é composto por substâncias ou elementos obtidos principalmente da dieta, como polifenóis, carotenoides, vitaminas (C e E) e minerais (Se, Cu, Zn, Mg) (RATNAM et al., 2006; COSTANTINI, 2019).

As reações catalisadas por cada enzima são descritas na Figura 4. A metaloenzima SOD pode ser considerada a mais importante do sistema de defesa antioxidante enzimático, pois além de estar presente em todas as células, converte o instável ânion $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , em um processo denominado dismutação. É encontrada em três isoformas, sendo a SOD1 citoplasmática (Cu/ZnSOD), a SOD2 mitocondrial (MnSOD) e a SOD3 extracelular (Cu/ZnSOD) (PERRY et al., 2010). Já as enzimas CAT e GPx catalisam a neutralização do H_2O_2 em H_2O . A enzima CAT é altamente eficiente, sua velocidade enzimática corresponde a catálise de 10^6 moléculas de H_2O_2 por minuto e é encontrada nas mitocôndrias, núcleo, mas principalmente nos peroxissomos, uma vez que se tem alta concentração de H_2O_2 nessa organela. Além disso, essa reação de detoxificação é muito importante, pois evita que o H_2O_2 se difunda pelas membranas celulares, como a do núcleo, e para que se impeça a formação de $OH\bullet$ por meio de H_2O_2 (MASTERS; PEGG; CRANE, 1986; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO et al., 2006).

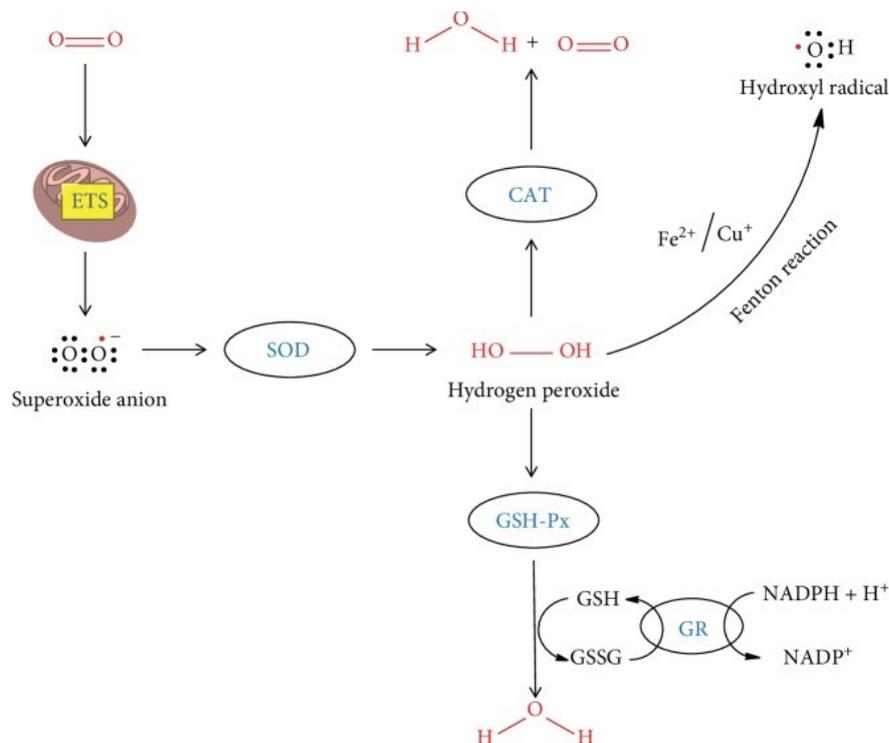


Figura 4: Relação entre enzimas antioxidantes. Fonte: NANDI et al., 2019.

O sistema glutatona também compõe a defesa antioxidante endógena, a qual está envolvida na modulação da resposta imune, inflamatória, sinalização redox, regulação da proliferação celular, apoptose e respiração mitocondrial (DENEKE; FANBURG, 1989; EVANS; CHURCH; PRYOR, 1991; BROWN, 1994; DROGE; ECK; MIHM, 1994). Constituindo-se de um tripeptídeo, a molécula glutatona é formada a partir de glutamato, cisteína e glicina, sendo que em média 90% da glutatona total das células se encontram na forma reduzida (GSH) e o remanescente na forma oxidada (GSSG). A reação de redução é catalisada pela enzima GPx, que transforma H_2O_2 em água, estando vinculada a oxidação de GSH a GSSG (MEISTER; ANDERSON, 1983; JOSEPH et al., 1997). Para que as moléculas de glutatona sejam recicladas e voltem a atuar no sistema antioxidante, a enzima Glutaciona Redutase (GR), na presença de NADPH, reduz GSSG a GSH (Kinnula; Crapo; Raivio, 1995). A relação entre GSH e GSSG é muitas vezes empregada para se estimar o status redox dos sistemas biológicos, no qual um ambiente redutor deve apresentar uma razão GSH/GSSG alta, fundamental para homeostase intracelular (SIES; MOSS, 1978; MEISTER; ANDERSON, 1983; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O conceito de “estresse oxidativo” era definido no passado como um “desbalanço entre as espécies oxidantes e antioxidantes, no qual há uma maior concentração de oxidantes

em detrimento dos antioxidantes” (SIES; CADENAS, 1985). No entanto, essa definição leva em consideração um estado estacionário em que exista um equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, sem que ocorra nenhum dano oxidativo, o que não é verdade na realidade dos sistemas vivos (COSTANTINI, 2019). As condições fisiológicas oferecem um ambiente apropriado para que se tenha um caráter pró-oxidante, já que lipídeos insaturados presentes nas membranas e muitas reações oxidativas acontecem no metabolismo normal dos organismos (JORDÃO Jr. et al., 1998). Deste modo, um conceito mais abrangente foi proposto e diz que o estresse oxidativo é “a consequência da interrupção/desregulação da sinalização e controle redox, toda vez em que se tem uma perturbação na homeostase entre espécies oxidantes e antioxidantes” (JONES, 2006).

O estresse oxidativo tem sido implicado em muitos distúrbios degenerativos metabólicos e neurológicos. As doenças degenerativas, em que a função e a estrutura de um tecido ou órgãos se deterioram ao longo do tempo, como na doença de Alzheimer, doença de Parkinson, diabetes, catarata, câncer e doenças cardiovasculares, foram atribuídas a condições de estresse oxidativo e ao processo de envelhecimento natural. Assim, o estresse oxidativo, o envelhecimento e as doenças degenerativas estão interligados (NANDI et al., 2019).

Ainda, muitos trabalhos nos últimos anos vêm demonstrando a importância das ERO e do estresse oxidativo na patogênese dos vírus (Revisado por Camini et al., 2017). Além da importância do estresse oxidativo na infecção pelo MAYV demonstrada por trabalhos prévios do nosso grupo (CAMINI et al., 2017; CAMINI et al., 2018; CAETANO et al., 2019; FERRAZ et al., 2021), também demonstramos que esse evento também pode contribuir para a patogênese do ZIKV em camundongos (ALMEIDA et al., 2020). Também já foi relatado envolvimento do estresse oxidativo nas infecções virais causadas pelos vírus da encefalite japonesa (Japanese encephalitis virus– JEV) (ZHANG et al., 2014), encefalite do carrapato (Tick-Borne encephalitis virus – TBEV), vírus do Oeste do Nilo (West Nile virus – WNV) (ZHANG; RONG; LI, 2019), vírus da febre de Rift Valley (Rift Valley fever virus – RVFV) (NARAYANAN et al., 2011), vírus sincicial respiratório (Respiratory syncytial virus– RSV) (HOSAKOTE et al., 2009; HUANG et al., 2010) e Influenza virus (AKAIKE et al., 1996), dentre outros.

Diante do exposto até agora, os antioxidantes, como classe de compostos capazes de neutralizar o estresse oxidativo e mitigar seus efeitos na saúde dos indivíduos, ganharam enorme atenção da comunidade de pesquisa biomédica, pois esses compostos não apenas

mostraram um bom grau de eficácia em termos de prevenção e / ou tratamento de doenças, mas também devido à percepção geral de que estão isentos de efeitos colaterais. Se é verdade que os antioxidantes podem ser muito úteis na prevenção, manejo ou tratamento de patologias humanas, também é verdade que eles não são imunes a gerar efeitos adversos (PIZZINO et al., 2017). Por isso, os estudos envolvendo compostos antioxidantes serão sempre muito importantes no combate as mais diversas doenças que atingem os humanos. Abaixo são descritos alguns importantes antioxidantes, objetos de estudo desse trabalho.

2.5 SILIMARINA

O cardo de leite (*Silybum marianum*) era usado na Grécia clássica para tratar doenças do fígado e da vesícula biliar. Recentemente, foi investigado para uso como um citoprotetor, um anticarcinogênio e no tratamento de suporte para danos no fígado por envenenamento por *Amanita phalloides*. Seu ingrediente ativo é a Silimarina, encontrada principalmente nas sementes (RAINONE, 2005).

A Silimarina, que está registrado no Chemical Abstracts Service (CAS - número 84604-20-6), tem como principais componentes bioativos 7 flavonolignanos, com o mesmo peso molecular (482), derivados do único flavonoide taxifolina (MW 326). A estrutura da taxifolina revela que os flavonoides são compostos polifenólicos que possuem 15 átomos de carbono, com dois anéis benzênicos, e pode ser abreviada como C6-C3-C6. Em uma preparação típica de Silimarina, as porcentagens aproximadas dos 8 componentes principais são silibina A (16%), silibina B (24%), isossilibina A (6%), isossilibina B (4%), silidianina (16%), silicristina (12%), isossilicristina (2%) e taxifolina (2%), como demonstrado na figura 5. O total da composição do produto é inferior a 100% porque um extrato típico é geralmente rotulado como de 70% a 80% sendo Silimarina, com o restante consistindo em polifenóis não caracterizados e ácidos graxos alifáticos, como os ácidos oleico e palmítico (POLYAK; FERENCI; PAWLOTSKY, 2013).

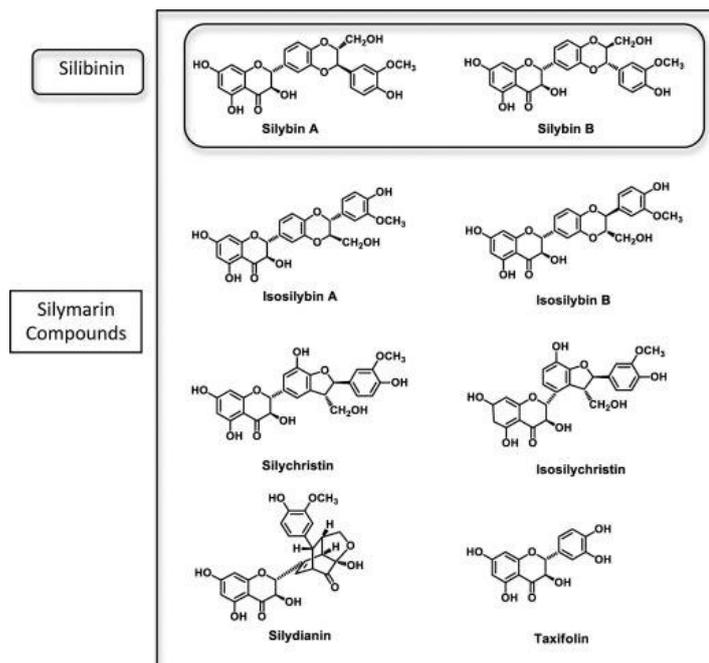


Figura 5: Estruturas e nomenclatura dos compostos encontrados na Silimarina. Fonte: POLYAK; FERENCI; PAWLITSKY, 2013.

Destacando-se principalmente pelo seu potente efeito antioxidante, os grupos hidroxilas funcionais dos constituintes da Silimarina agem eliminando os radicais livres por meio da doação de átomos hidrogênio, inibindo assim as reações de oxidação (KUMAR; PANDEY, 2013). Além de eliminar ERO, a Silimarina é capaz de aumentar os níveis de antioxidantes endógenos importantes, como a glutathione e a SOD, o que contribui para redução da oxidação lipídica e proteica, reduzindo os danos oxidativos celulares (FRASCHINI; DEMARTINI; ESPOSTI, 2002; TOKLU et al., 2008). É estimado que atividade antioxidante da Silimarina seja pelo menos 10 vezes maior que da vitamina E (Ross, 2008).

Dentre suas propriedades bioativas, a Silimarina já mostrou efeitos benéficos no tratamento de doenças como câncer, diabetes, hepatites, doença gordurosa do fígado não alcoólica, infecções pelos vírus da hepatite B e C (HBC e HCV), síndrome metabólica, depressão, doenças cardiovasculares e talassemia (CAMINI; COSTA., 2020).

Em relação a seus efeitos contra os alfavírus, em estudo conduzido por Lani et al. (2015), a Silimarina demonstrou atividade antiviral *in vitro* contra o CHIKV. Ela suprimiu os estágios de pós-entrada do vírus nas células, mais provavelmente a replicação do RNA viral. A expressão de proteínas necessárias para a replicação do RNA viral, e também a expressão da proteína estrutural E2, foram reguladas negativamente.

Devido à similaridade entre o CHIKV e o MAYV, o trabalho supracitado foi importante base para trabalhos posteriores publicados por nosso grupo, onde a Silimarina demonstrou resultados promissores em estudos *in vitro* (CAMINI et al., 2018) e *in vivo* (CAETANO et al., 2019; FERRAZ et al., 2021) frente a infecção contra o MAYV. A proposta de usar a Silimarina neste presente estudo vem do fato de já conhecermos sua ação antioxidante e antiviral contra o MAYV, portando aqui podemos utilizá-la como parâmetro de controle e comparação em relação aos demais compostos utilizados.

2.6 N-ACETILCISTEÍNA (NAC)

A N-acetilcisteína (NAC) (Figura 6), um precursor do antioxidante glutathiona, tem sido usada por décadas para liberar o muco espesso nos pulmões e tratar a overdose de paracetamol (SHI, 2020). Os mecanismos moleculares subjacentes a esses dois efeitos são bem conhecidos. Em particular, seu efeito mucolítico é devido à capacidade da NAC em quebrar as pontes dissulfeto nas glicoproteínas de alto peso molecular do muco, resultando em viscosidade reduzida. O efeito da NAC no envenenamento por paracetamol é resultado da sua ação na reposição de glutathiona hepática reduzida (GSH), que é a principal peptídeo nucleofílico endógeno que reage com e neutraliza moléculas eletrofílicas e, portanto, prejudiciais, tal como N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), o metabólito eletrofílico de paracetamol (ALDINI et al., 2018).

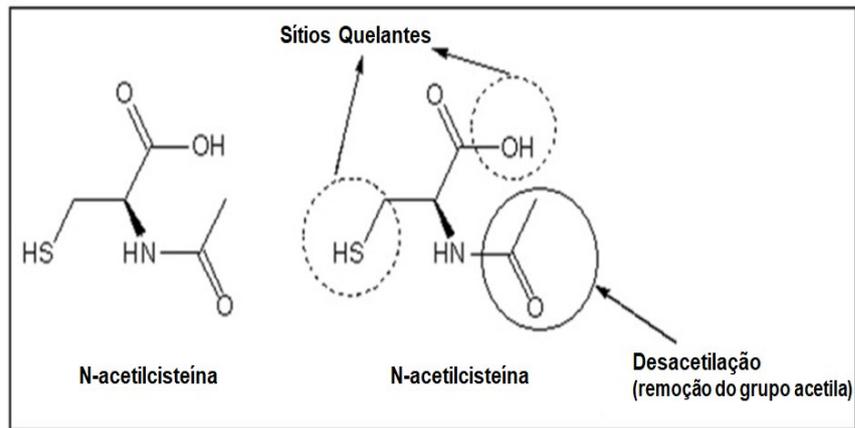


Figura 6: Estrutura da N-acetilcisteína (NAC). A figura mostra a estrutura da NAC, com seus dois sítios quelantes (tiol e hidroxila) e uma desacetilação responsável por seu potencial antioxidante devido à geração de glutathiona. Fonte: ADAPTADO - SWARAN, 2009.

Quando o tratamento com NAC inibe um determinado processo ou resposta celular, normalmente conclui-se que as ERO desempenham um papel ativo nele (EZERINA et al., 2018). NAC detoxifica as ERO, mas seu principal efeito como um antioxidante terapêutico decorre de seu papel como um precursor da cisteína, importante para síntese de glutathiona. Em condições de estresse oxidativo, a glutathiona se esgota e isso pode ser revertido pela suplementação de NAC. A defesa celular contra o estresse oxidativo pode incluir a redução de hidroperóxidos por glutathiona peroxidases e reações de conjugação que são catalisadas por glutathiona-S-transferases (DODD et al., 2008).

Em estudo conduzido por Treitlinger et al. (2004), a NAC foi utilizada como agente terapêutico para pacientes com AIDS, pois foi capaz de reduzir a multiplicação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). De acordo com os autores, uma diminuição significativa foi observada na carga viral, nos níveis de TNF-alfa e IL-8 e na apoptose de linfócitos, com um aumento significativo nos níveis e viabilidade de linfócitos CD4+.

Estudos envolvendo células epiteliais pulmonares (A549) infectadas com o vírus Influenza (H5N1) também foram conduzidos, fazendo uso da NAC como agente terapêutico. Em concentrações que variaram de 5 a 15mM, a NAC reduziu os efeitos citopatogênicos induzidos pelo H5N1, a apoptose induzida pela infecção, e também diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (CXCL8, CXCL10, CCL5 e IL-6) nas células infectadas (GEILER et al., 2010). A NAC também já demonstrou atividade antioxidante na infecção pelo *Rift Valley Fever virus* (RVFV) (Narayana, et al., 2011) e também demonstrou um bom resultado

no tratamento de hepatite grave associada à Dengue, além de possuir atividade antiviral contra esse vírus (Habragamuwa; Dissanayaka, 2014; Sreekanth, et al., 2019).

Um estudo recente buscou propor o uso da NAC como tratamento adjuvante para melhorar as estratégias terapêuticas contra a Covid-19, pelo fato de ter baixo custo, toxicidade muito baixa, e ser aprovada pelo FDA há muitos anos, além de seus efeitos terapêuticos benéficos como diminuição das ERO, reposição de GSH intracelular, supressão de citocinas pró-inflamatórias e proteção de células T. A administração de NAC em combinação com outros agentes antivirais poderia reduzir a taxa de admissão hospitalar, ventilação mecânica e mortalidade (SHI, 2020).

Temos então que, antioxidantes como a NAC representam um potencial tratamento que deve ser mais investigado em pesquisas envolvendo vírus, para que seu papel como um composto terapêutico opcional seja melhor avaliado. Assim como discutido por Dodd (2008), devido ao papel onipresente das defesas oxidativas em muitas doenças, a NAC deve continuar a ser testada para novas indicações.

2.7 FULEROL

Os fulerenos têm atraído atenção considerável em diferentes campos da ciência desde sua descoberta em 1985. As investigações das propriedades físicas, químicas e biológicas dos fulerenos renderam informações promissoras (BAKRY et al., 2007). O Fulerol é um produto derivado do fulereno C_{60} [$C_{60}(OH)_{24}$], solúvel em água, com reatividade ambiental mal definida, propriedades materiais distintas e atividade biológica, que têm recebido grande atenção hoje (KOVAC et al., 2018).

De acordo com Ladeira (2016), dentre os agentes antioxidantes, o Fulerol tem ganhado destaque por sua capacidade de complexar e inativar as ERO e inibir seus danos oxidativos. Esse nanocomposto de carbono esférico é hoje reconhecido como poderoso antioxidante devido sua alta reatividade frente a moléculas eletronicamente instáveis, sendo um dos objetos moleculares de maior número de ligações tipo pi por unidade de volume. Ensaios *in vitro* mostraram os efeitos protetores do Fulerol nas alterações moleculares e bioquímicas induzidas pelo tratamento com os agentes hipertróficos isoproterenol e fenilefrina em células cardíacas provenientes de ratos Wistar. O tratamento com Fulerol preveniu o aumento dos níveis de ERO e da área celular, reduzindo a expressão de proteínas envolvidas na sinalização

hipertrofica, a calcineurina e o fator nuclear ativado por células T (NFAT), nos cardiomiócitos tratados com os agonistas adrenérgicos. Nos estudos *in vivo*, foi observado que o tratamento concomitante com o Fulerol foi capaz de reduzir o processo de lipoperoxidação induzido pelo tratamento com isoproterenol em ratos Wistar, contribuindo para a melhoria da função cardíaca e dinâmica do cálcio e na redução da fibrose e hipertrofia dos cardiomiócitos ventriculares. Assim, no estudo conduzido por Ladeira (2016), o Fulerol mostrou atividade antioxidante capaz de prevenir os efeitos deletérios do estresse oxidativo no sistema cardiovascular.

Em um estudo conduzido por Pereira et al. (2021), o Fulerol foi avaliado no contexto da infecção pelo ZIKV. Neste estudo, o Fulerol apresentou alto poder antioxidante em baixas concentrações. A infecção em células de glioblastoma humano por ZIKV aumentou a produção de ERO e após o tratamento com Fulerol, os níveis de ERO foram diminuídos a níveis basais. Ainda, o Fulerol foi capaz de reduzir a produção viral em até 90% nessas células, demonstrando que é um candidato promissor no controle de infecções pelo ZIKV, apresentando ação antioxidante e antiviral. Em nosso estudo, portanto, incluímos o Fulerol para avaliar se apresentaria além da atividade antioxidante, atividade antiviral contra o MAYV.

2.8 QUERCETINA

A Quercetina (3,5,7-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4Hchromen-4-one) é um pigmento encontrado em diversas plantas que pertence à classe dos flavonoides. Sua estrutura está demonstrada na figura 7. Pode ser encontrada em alimentos como a cebola, tomate, alcaparra, alface, brócolis, chá verde e chá preto (HERTOG, et al., 1993; NIJVELDT, et al., 2001; MANACH, et al., 2005; BISCHOFF, 2008). Pode ser denominada aglicona ou forma sem açúcar da Rutina (aglicona da Rutina) (BAGHEL, et al., 2012).

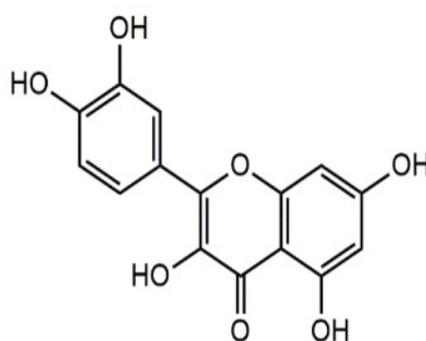


Figura 7: Estrutura da Quercetina. Fonte: Maalik, et al., 2014.

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

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

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

Como a Quercetina é um antioxidante, sendo assim capaz de eliminar radicais livres, ela pode auxiliar na prevenção de cânceres que possam ser induzidos por estresse oxidativo (BAGHEL, et al., 2012). Em uma baixa dose inibiu a proliferação de células de mama cancerosas (humanas), resultando na parada do ciclo celular na fase G1 (JEONG et al., 2009). Outro estudo demonstra que a Quercetina previne o câncer por meio da indução de apoptose e

modulação da sinalização de PKC (proteína quinase C), com a redução de estresse oxidativo em células de camundongos com linfoma (MAURYA; VINAYAK, 2015).

Além disso, a Quercetina e/ou seus derivados já demonstraram atividade antiviral contra o DENV (ZANDI et al. 2011), HCV (BACHMETOV et al., 2012), H1N1 (UCHIDE; TOYODA, 2011; FAN, et al., 2011) CHIKV, MAYV, Ebola, Epstein-Barr, HBV e vírus da diarreia suína (CHAABI, 2020; SANTOS, et al., 2014; ROJAS, et al., 2016; QIU et al., 2016; CHENG, et al., 2015; SONG; SHIM; CHOI, 2011). Santos et al. (2014) demonstrou atividade anti-MAYV da quercetina. No estudo supracitado, foi utilizado MOI de 0,1 e uma cepa do MAYV diferente da usada em nossa pesquisa, gerando pontos interessantes para a inclusão da quercetina em nosso estudo, para comparação de resultados em análises posteriores.

Levando em consideração o potencial antioxidante da Quercetina, seu efeito anti-MAYV já descrito na literatura, este presente estudo incluiu esse composto para ser utilizado frente à infecção pelo MAYV em células Vero, para testar sua efetividade no modelo experimental aqui proposto.

2.9 RUTINA

A Rutina ou Vitamina P (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona-3-ramnoglicosídeo) é um flavonoide heterosídeo (glicosídeo) (HARBORNE, 1986), que pode ser chamada também de quercetina-3-rutinosídeo, rutosídeo e soforina (KREFT, KNAPP, KREFT, 1999). É encontrada em diversos alimentos como vinho tinto, chá preto, uva, trigo-sarraceno, maçã, cebola, feijão vermelho, tomate e maracujá (HOLLMAN; HERTOOG; KATAK, 1996; HARBORNE, 1986). Entre os flavonoides, a Rutina é um dos que mais se destacam em relação a suas propriedades farmacológicas (PEDRIALI, 2005) (Figura 8).

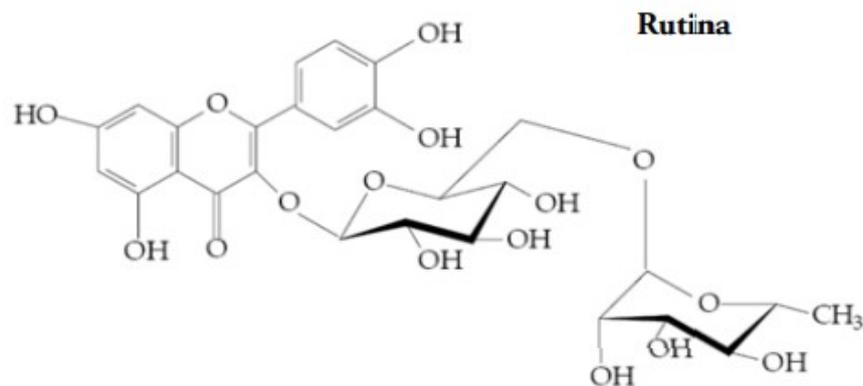


Figura 8: Estrutura da Rutina. Fonte: Pedriali, 2005.

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

A Rutina também já demonstrou uma atividade anti-hipercolesterolêmica, antidiabética (SRINIVASAN; KAUL; RAMARAO, 2005; KANASHIRO et al., 2009; DA SILVA et al., 2001) e hepatoprotetora, diminuindo os níveis das transaminases hepáticas (ALT e AST) no fígado, soro e coração de ratos (FERNANDES et al., 2010).

As ERO têm sido associadas à patogênese de certos tipos de cânceres (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017), e a Rutina tem sido muito estudada em relação aos possíveis efeitos antineoplásicos e anticancerígenos, por sua ação antioxidante. Em um estudo, a Rutina demonstrou uma redução significativa no tamanho do tumor em camundongos que apresentavam uma linhagem de células de leucemia humana implantadas (HL-60) (LIN et al., 2012). Esse flavonoide também demonstrou um efeito anti-neuroblastoma, inibindo consideravelmente o crescimento de células LAN-5 (células de neuroblastoma humano) (CHEN et al., 2013). A Rutina também parece ser útil como um auxiliar na radioiodoterapia (GONÇALVES et al., 2013).

Estudos indicam que a Rutina também é neuroprotetora, atuando na prevenção de neuroinflamação (KHAN et al., 2009; TONGJAROENBUANGAM et al., 2011); promove a

sobrevivência das células da crista neural (NONES et al., 2012); atua como anticonvulsivante (NIEOCZYM et al., 2014); possui atividade anti-Alzheimer (JAVED et al., 2012; TONGJAROENBUANGAM et al., 2011) e efeito como antidepressivo (MACHADO et al., 2008).

Ainda, a Rutina já também demonstrou efeito antiviral contra a cepa da gripe aviária H5N1 (IBRAHIM et al., 2013) e um análogo da Rutina, o sulfato de Rutina de sódio, pode ser um novo candidato para o desenvolvimento de um agente anti-HIV-1 / HSV (TAO et al., 2007). A Rutina pode inibir o DENV (ZANDI et al. 2011) e ainda, em concentração de 100µM inibi em mais de 40% as atividades da protease NS2B-NS3 do ZIKV (LIM, et al., 2016).

Assim, por seus efeitos antioxidantes e antivirais já descritos, a Rutina foi incluída nesse estudo para verificar suas ações frente à infecção pelo MAYV.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos antioxidantes Silimarina, N-aceilcisteína, Fulerol, Quercetina e Rutina na produção de ERO após a infecção pelo MAYV e na multiplicação viral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em células Vero controles, infectadas com o MAYV e infectadas com MAYV e tratadas com os antioxidantes Silimarina, N-acetilcisteína, Fulerol, Quercetina e Rutina, em diferentes tempos, avaliar:

- I. A produção de ERO;
- II. A atividade antiviral global;
- III. A formação de partículas virais infecciosas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CÉLULAS, VÍRUS E COMPOSTOS

4.1.1 Células

As células de linhagem contínua Vero são fibroblastos derivados de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e foram obtidas originalmente da American Type Culture Collection (ATCC; EUA). As mesmas foram cultivadas e mantidas em garrafas de cultivo celular de 75cm² utilizando meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco, com alta concentração de glicose (DMEM HG; Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, EUA) e um coquetel dos antimicrobianos usuais: estreptomicina (100µg/mL; Sigma-Aldrich, EUA), penicilina potássica (100U/mL; Sigma-Aldrich, EUA) e anfotericina B (2,5µg/mL; Sigma-Aldrich, EUA). O cultivo celular foi realizado conforme preconizado pela ATCC (2014), sendo a cultura repicada a cada 2 – 3 dias e mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, com atmosfera umidificada.

Como se trata de uma cultura aderente, para os repiques as células foram lavadas duas vezes com tampão salina fosfato (PBS; 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 3mM KCl, pH 7,2) e, em seguida, submetidas a ação enzimática com tripsina-EDTA 0,05% para que se desprendessem do frasco e umas das outras. Logo após, a suspensão celular foi transferida para outra garrafa estéril e adicionado quantidade necessária de meio de cultura.

4.1.2 Origem do vírus, produção do estoque trabalho e titulação

O MAYV, cepa Acre27 (número de acesso ao GenBank KM400591), foi originalmente isolado em junho de 2004 durante uma pesquisa epidemiológica a partir de amostra de sangue de uma paciente febril e malária negativo de Acrelândia – Bacia Amazônica, Acre, Brasil (Terzian et al., 2015). A amostra foi gentilmente cedida pelo Professor Dr. Maurício Lacerda Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São Paulo).

O estoque de vírus foi produzido em células Vero recém-confluentes, infectadas com uma multiplicidade de infecção (moi) de 0,01, com volume mínimo de meio de cultura e ausência de SFB. Após infecção, as células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante 1 hora, com agitação a cada 10min para favorecer a adsorção viral. Logo após, o meio foi completado e suplementado com 1% SFB, seguida de nova incubação por aproximadamente 48h ou até o aparecimento de 90% de efeito citopático (ECP) – sincícios, grumos, células soltas – quando comparado às células controles. O sobrenadante da cultura infectada passou por um processo de clarificação após centrifugação a 5000rpm por 5min a 4°C, a fim de remover os debris celulares. Assim, o sobrenadante clarificado foi alíquotado e mantido em freezer -80°C para posterior uso (Adaptado de Oliveira, 2008).

A titulação das amostras do estoque trabalho foi feita pelo método de contagem das Unidades Formadoras de Placas descrito por Dulbecco (Dulbecco, 1952). Este método consiste na infecção de células com diferentes diluições da amostra viral, com objetivo de encontrar uma diluição que seja possível quantificar o número das UFP. Para isso, em uma placa de seis poços, com células Vero previamente implantas (1×10^6 células/poço), foram adicionados 300µL de diluições seriadas do vírus em cada um dos poços, sendo um mantido como controle negativo da infecção. Após 1h de adsorção a 37°C com agitação a cada 10min, o inóculo viral foi retirado e adicionados 2,0mL de meio 199 semi sólido por poço, acrescido de 1,25% de carboximetilcelulose (CMC) e 1,5% SFB, sendo seguida de nova incubação por 48h. Então, o meio foi desprezado, as células fixadas em solução formol 10% por 30min e a monocamada celular corada com solução de cristal violeta 1% por 15min. O título viral foi calculado pelo número de UFP obtido no poço cuja diluição apresentou entre 30 e 300 placas de lise viral, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para UFP/mL, e o valor encontrado foi de $1,8 \times 10^8$ UFP/mL.

4.1.3 Compostos

Foram escolhidos cinco compostos com ação antioxidante bem descrita na literatura para a realização dos ensaios: Silimarina, N-acetilcisteína (NAC), Fulerol, Quercetina e Rutina. As concentrações aqui utilizadas foram escolhidas de acordo com trabalhos prévios do grupo ou de acordo com trabalhos da literatura, sendo essas concentrações não citotóxicas e com efeito antioxidante já demonstrado.

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

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

O Fulerol (C₆₀OH₂₂₋₂₄) foi sintetizado a partir do processo de poli-hidroxilação do fulereno (C₆₀) no Laboratório de Nanomateriais da UFMG conforme descrito por Ladeira (2016). Esse composto foi gentilmente cedido pelo Professor Breno de Mello Silva, do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismo da UFOP. O Fulerol foi armazenado a uma concentração estoque de 500nM e as alíquotas foram armazenadas no escuro a -80°C. A concentração utilizada nos ensaios foi de 12,5 nM, baseando-se em estudos anteriores realizados no nosso Laboratório (PEREIRA et al., 2021).

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

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

4.2 DOSAGEM DAS “ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO” (ERO)

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

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

Os ensaios foram realizados em placas brancas de poliestireno de 96 poços, nas quais foram adicionadas $2,5 \times 10^4$ células Vero (em meio DMEM HG) em cada cavidade e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para aderência. Após esse tempo, o meio DMEM HG foi descartado e as células foram lavadas com solução salina equilibrada de Hanks (HBSS) pH 7,4. Acrescentaram-se os compostos às células e logo depois essas foram infectadas com MAYV em uma moi de 5 utilizando o meio 199 sem vermelho de fenol (Sigma- Aldrich, EUA). Um total de 8 poços de células foram usados como controle negativo, 8 poços de células foram infectados com MAYV, 8 poços de células foram infectados com MAYV previamente inativado por luz ultravioleta (UV) e 8 poços de células foram infectados com MAYV e tratados com cada composto. A Silimarina foi utilizada na concentração de 100µg/mL, a N-acetilcisteína na concentração de 10mM, o Fulerol na concentração de 12,5nM, e a Quercetina e Rutina na concentração de 50µM.

Após 15 e 24 horas pós infecção (hpi) as células foram lavadas 2 vezes com HBSS e incubadas com 100µL/poço da sonda carboxi-H2DCFDA (25µM) por 45min a 37°C e 5% de CO₂, no escuro. Após a incubação, foram feitas leituras da intensidade de fluorescência à 485/535nm (excitação/transmissão) utilizando o leitor de microplaca tipo VICTORTM X3 Multilabel (Perkin Elmer, EUA), com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes com três replicatas cada.

4.3 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL GLOBAL PELO MTT

Para a realização desse experimento, células Vero foram distribuídas em placas de 96 poços (5×10^4 células/poço) e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂, para aderência. O meio foi removido e os compostos candidatos foram adicionados, nas concentrações indicadas acima, juntamente com 100µL de suspensão viral (moi de 5). Após 48h, as placas foram observadas sob o microscópio óptico e avaliou-se o grau de efeito citopático (ECP) como medida da inibição da multiplicação do vírus e então foi utilizado o MTT para confirmar os resultados observados pelo microscópio.

Para o ensaio de MTT, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 20µL de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5 – difeniltetrazol (MTT) (2 mg/mL) por poço e as placas foram incubadas por 1h. Posteriormente, foram adicionados 85µL do solvente DMSO (dimetilsulfóxido) em cada poço. O MTT é um composto que é reduzido por células com metabolismo ativo (viáveis), sendo convertido em cristais de formazam. Os cristais de formazam necessitam do DMSO para que sejam dissolvidos, uma vez que são insolúveis. Desse modo, a viabilidade celular é mensurada de forma indireta a partir da quantificação de cristais formazam produzidos (MOSMANN, 1983). A quantidade de formazam gerada foi mensurada por meio da leitura da absorbância a 490 nm no leitor de placas Victor X3 (PerkinElmer).

4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VÍRUS POR TITULAÇÃO

Para a realização deste ensaio foram utilizadas placas de 96 poços das quais foram adicionadas 5×10^4 células Vero (em meio DMEM HG) em cada poço e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para aderência. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados os compostos, nas concentrações indicadas acima, e logo depois a suspensão viral de MAYV numa moi de 5, sendo 12 poços de controle de células, 12 poços de células infectadas com MAYV (controle de vírus) e 12 poços de células para cada composto mais MAYV. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas. Após a incubação, para verificar a produção de vírus em células tratadas e infectadas, o sobrenadante das células foi coletado nos diferentes tempos (24 e 48h) e titulado em células Vero, conforme item 4.1.2.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados usando o software GraphPadPrism 8.0 e expressos como a média ± erro padrão (SEM). O teste t-student com 95% de confiança foi usado para determinar o nível de diferença entre os infectados, tratados 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.

5. RESULTADOS

5.1 PRODUÇÃO DE ERO EM CÉLULAS VERO INFECTADAS COM MAYV E TRATADAS COM OS ANTIOXIDANTES

Nosso grupo de pesquisa, em um estudo prévio, demonstrou que a infecção de células hepáticas humanas HepG2 e macrófagos murinos J774 com o MAYV induz a formação de ERO em diferentes tempos pi (1, 2, 4, 6, 15 e 24 horas) (Camini et al. 2017). Assim, para verificar se em células Vero a infecção pelo MAYV também culmina com maior produção de ERO e se os antioxidantes aqui usados (Silimarina, NAC, Fulerol, Quercetina e Rutina) são capazes de inibir esse aumento de ERO em células infectadas, nós avaliamos nos tempos de 24 e 48hpi a produção dessas espécies.

Como pode ser visto na Figura 9, a infecção pelo MAYV levou a um aumento nos níveis de ERO em células Vero, nos tempos 24 e 48hpi, quando comparado às células controles. Por sua vez, quando inativado pela luz UV, a infecção pelo MAYV não foi mais capaz de induzir nas células maior produção de ERO, sugerindo assim que a infectividade do vírus é importante para indução dessas espécies. Ainda, o tratamento com os diferentes antioxidantes, Silimarina (Fig. 9A), NAC (Fig. 9B), Fulerol (Fig. 9C), Quercetina (Fig. 9D) e Rutina (Figura 9E) foi capaz de inibir o aumento de ERO após a infecção pelo MAYV, nos diferentes tempos (24 e 48hpi), confirmando suas ações antioxidantes.

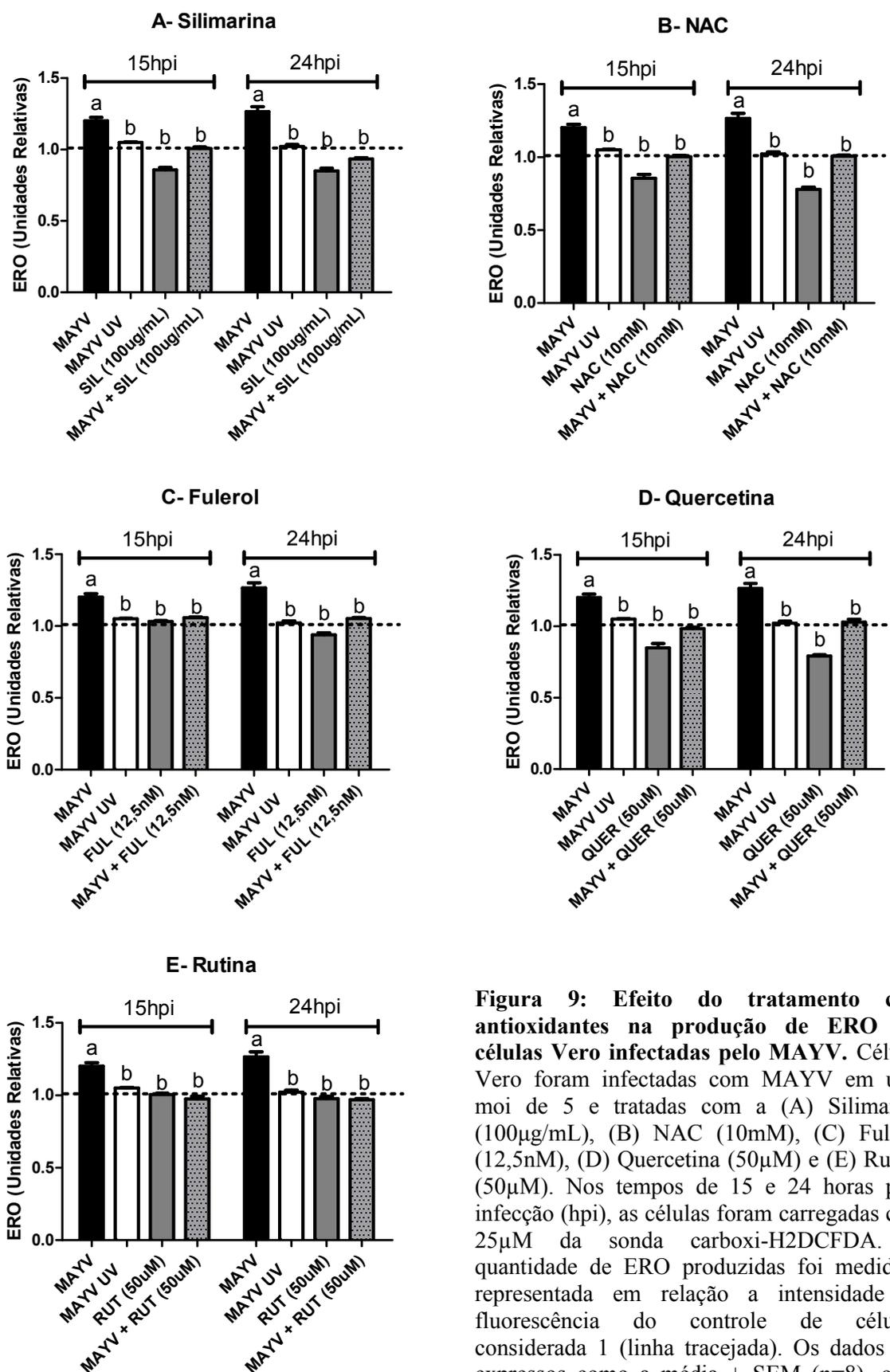


Figura 9: Efeito do tratamento com antioxidantes na produção de ERO em células Vero infectadas pelo MAYV. Células Vero foram infectadas com MAYV em uma moi de 5 e tratadas com a (A) Silimarina (100µg/mL), (B) NAC (10mM), (C) Fulerol (12,5nM), (D) Quercetina (50µM) e (E) Rutina (50µM). Nos tempos de 15 e 24 horas pós-infecção (hpi), as células foram carregadas com 25µM da sonda carboxi-H2DCFDA. A quantidade de ERO produzidas foi medida e representada em relação a intensidade de fluorescência do controle de células, considerada 1 (linha tracejada). Os dados são expressos como a média ± SEM (n=8), onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística (p<0,05, ANOVA).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL GLOBAL DA SILIMARINA, NAC, FULEROL, QUERCETINA E RUTINA CONTRA O MAYV

Uma vez que a pergunta central desse trabalho era qual a importância ou influência que as ERO exercem na multiplicação do MAYV, o próximo fato foi avaliar se os antioxidantes aqui testados, por inibirem ERO poderiam alterar a multiplicação do MAYV em células Vero. Para tal, foi feito um ensaio de atividade antiviral global utilizando-se o MTT, que avaliou a viabilidade celular após a infecção e os tratamentos.

Como mostra a Figura 10, células Vero infectadas com o MAYV (CV) após 48h perderam quase 100% de viabilidade, mostrando que o vírus foi capaz de multiplicar eficientemente, matando as células. Nas células infectadas e tratadas com os diferentes antioxidantes, nota-se que somente a Silimarina (Sil) foi capaz de proteger às células da infecção, apresentando as células quase 75% de viabilidade, confirmando seu efeito antiviral anti-MAYV, como já demonstrado em estudos anteriores do grupo. No entanto, nenhum outro antioxidante aqui usado, N-acetilcisteína (Nac), Fulerol (Ful), Quercetina (Que) e Rutina (Rut) foram capazes de proteger as células da infecção, uma vez que as células infectadas e tratadas com esses compostos perderam a viabilidade de forma semelhante às células somente infectadas (CV).

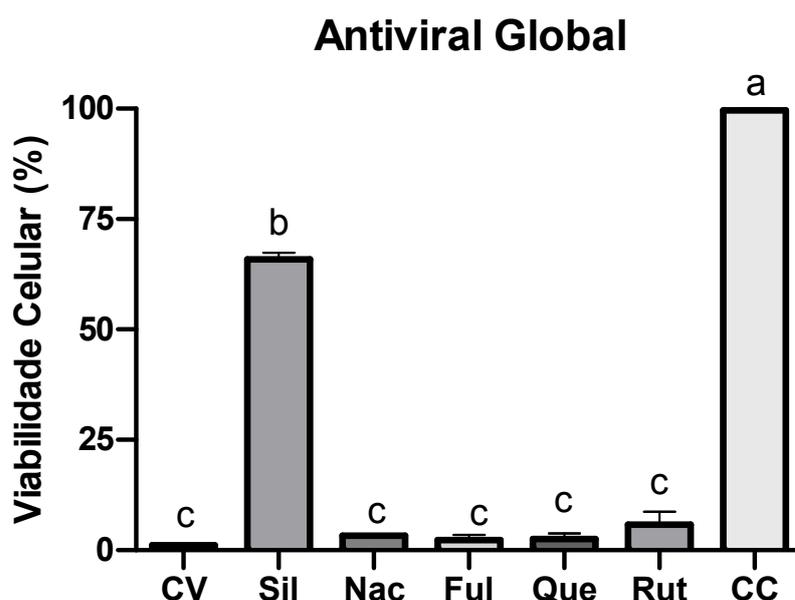


Figura 10: Ensaio de viabilidade em células Vero infectadas com MAYV e tratadas com diferentes antioxidantes. Células Vero foram infectadas com MAYV (moi de 5) e tratadas com Silimarina (100µg/ml), NAC (10mM), Fulerol (12,5nM), Quercetina (50µM) ou Rutina (50µM). Após 48h a viabilidade das células foi revelada pelo ensaio de MTT. Os dados são expressos como a média \pm SEM (n=12), onde letras diferentes (a,b,c) representam diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA). CC: controle de células (células não infectadas e não tratadas); CV: controle de vírus (células infectadas e não tratadas); Sil: células infectadas e tratadas com Silimarina; Nac: células infectadas e tratadas com N-acetilcisteína; Ful: células infectadas e tratadas com Fulerol; QUER: células infectadas e tratadas com Quercetina; RUT: células infectadas e tratadas com Rutina.

5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VÍRUS EM CÉLULAS INFECTADAS COM MAYV E TRATADAS COM OS ANTIOXIDANTES SILIMARINA, NAC, FULEROL, QUERCETINA E RUTINA

Para verificar se os antioxidantes aqui usados poderiam interferir na produção de partículas virais infecciosas 24 e 48hpi, os sobrenadantes de células Vero infectadas com MAYV e tratadas com os antioxidantes Silimarina, NAC, Fulerol, Quercetina e Rutina foram titulados pela contagem das UFP.

Como pode ser observado na Figura 11, o título do MAYV em células Vero foi reduzido após tratamento com a Silimarina nos tempos de 24hpi (Fig. 11A) e 48hpi (Fig. 11B), com redução próxima de 2 unidades logarítmicas (2 logs). Esse resultado confirma o efeito anti-MAYV da Silimarina já demonstrado por nosso grupo em outra linhagem celular (HepG2) e em modelo animal (CAETANO et al., 2017; FERRAZ et a., 2021).

Também observamos nas células infectadas e tratadas com o antioxidante NAC uma redução nos títulos virais (cerca de 1 log) após 24h (Fig. 11A). No entanto, esse efeito anti-MAYV da NAC não se manteve no tempo de 48hpi (Fig. 11B). Por sua vez, nenhum dos outros antioxidantes testados, Fulerol, Quercetina e Rutina, apresentaram redução dos títulos virais, ou seja, não demonstraram nenhum efeito na inibição da multiplicação do MAYV nos diferentes tempos analisados.

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

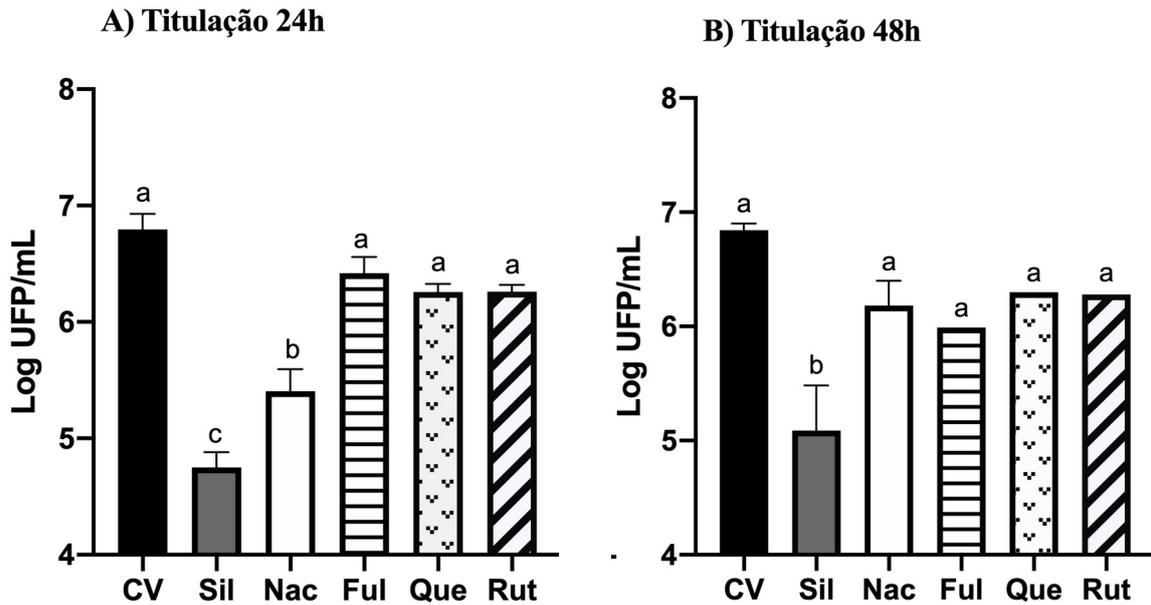


Figura 11: Título de MAYV em células Vero tratadas com diferentes compostos após 24 e 48 horas pós-infecção (hpi). Células Vero foram infectadas com MAYV (moi 5) e tratadas com Silimarina (100µg/ml), NAC (10mM), Fulerol (12,5nM), Quercetina (50µM) e Rutina (50µM). Após 24 (A) e 48 horas (B), os sobrenadantes das células foram coletados e titulados em células VERO para determinação dos títulos virais. Os dados são expressos como a média ± SEM (n=6), onde letras diferentes (a,b) representam diferença estatística (p<0,05, ANOVA). CV: controle de vírus (células infectadas e não tratadas); Sil: células infectadas e tratadas com Silimarina; Nac: células infectadas e tratadas com N-acetilcisteína; Ful: células infectadas e tratadas com Fulerol; Que: células infectadas e tratadas com Quercetina; Rut: células infectadas e tratadas com Rutina.

6. DISCUSSÃO

As infecções virais estão se tornando mais comuns em todo o mundo. As pessoas que vivem nos países mais pobres representam a população mais afetada devido às condições sanitárias precárias e falta de cuidados básicos de saúde. Identificar o principal culpado de novas epidemias é o fator mais importante no controle de surtos de doenças (RESHI, 2014).

Desde que o MAYV foi isolado há algumas décadas, mais estudos relacionados a este patógeno se fazem necessários para que possamos conhecer a fundo as características que influenciam sua patogênese. É importante destacar que a Febre Mayaro é uma doença tropical negligenciada. Essa doença é endêmica em áreas de baixos determinantes socioeconômicos, que são tipicamente caracterizadas por um baixo investimento em pesquisa, vigilância e controle de surtos (MOTA, 2015). Ademais, a literatura sobre o MAYV é escassa, principalmente no que diz respeito aos mecanismos da artrite induzida pelo vírus e sua persistência, que são ainda pouco conhecidos (CAVALHEIRO et al., 2016).

Em 1979, Peterhans realizou um dos primeiros trabalhos demonstrando a produção de ERO frente a infecção viral pelo vírus Sendai. A ativação de fagócitos induzida por vírus está associada ao estresse oxidativo, não só porque ERO são liberadas, mas também porque os fagócitos ativados também podem liberar citocinas pró-oxidantes, como fator de necrose tumoral (TNF) (HALLIWELL, 1987; SCHWARZ, 1996). Desde então, outros estudos já se propuseram a investigar o papel das ERO em infecções virais. Neste trabalho, tratamos principalmente de estudar o papel dessas espécies na multiplicação do MAYV.

Esta pesquisa trata-se da continuação de trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, onde algumas perguntas relacionadas ao MAYV ainda permaneciam sem resposta. Em nosso histórico, Camini et al. (2017) mostraram que em células hepáticas humanas HepG2 e macrófagos murinos J774, o MAYV induziu um aumento de ERO e alterou as defesas antioxidantes, desencadeando o estresse oxidativo, sugerindo assim que esse pode ser um fator importante na patogênese do vírus. Tais constatações foram importantes para que se entendesse melhor a patogênese do MAYV e foi o primeiro estudo a mostrar aumento de ERO em células hospedeiras após a exposição ao MAYV e consequente estresse oxidativo. Mais tarde, nosso grupo avaliou a capacidade da Silimarina em reverter os danos oxidativos acarretados pela infecção. Assim, foi verificado que em células HepG2,

além de diminuir a produção de ERO e o estresse oxidativo desencadeados pelo MAYV, a Silimarina também apresentou significativa atividade antiviral (Camini et al., 2018).

Mais recentemente, um estudo publicado por nosso grupo também demonstrou as ações benéficas da Silimarina contra a infecção pelo MAYV em um modelo *in vivo*. A infecção causada pelo MAYV em camundongos BALB/c de três semanas de vida, após 5 dias de infecção, resultou em diferentes alterações hematológicas e hepatológicas, com descontrole da homeostase redox no fígado, aumento dos níveis séricos das transaminases hepáticas (AST e ALT), hepatite, aumento no status pró-oxidante, redução no status antioxidante e inflamação. No entanto, o tratamento dos animais com a Silimarina em uma dose de 100mg/kg/dia restabeleceu ou melhorou significativamente todas as alterações aqui avaliadas decorrentes da infecção, bem como diminuiu a carga viral no fígado, baço, patas, músculo quadríceps e cérebro, reforçando o efeito antiviral, antioxidante e hepatoprotetor da Silimarina na infecção causada pelo MAYV (FERRAZ et al., 2021).

Neste presente estudo, os resultados em células Vero demonstraram o aumento de ERO após infecção pelo MAYV, 15 e 24hpi, estando em consonância com as pesquisas previamente citadas, confirmando que a indução de ERO é um evento conspícuo após a infecção pelo MAYV. Cavalheiro et al. (2016) também mostraram que durante a infecção pelo MAYV, macrófagos ativados podem produzir ERO, que estariam envolvidas no controle da multiplicação do vírus, danos em tecidos-alvo, bem como na morte celular induzida pela infecção. O trabalho avaliou a produção de ERO durante infecção por MAYV de células RAW 264.7 (macrófagos murinos) e demonstrou que MAYV induz um aumento progressivo na geração de ERO nos primeiros tempos de infecção (6h), quando há intensa multiplicação viral e que a infecção por macrófagos com MAYV resulta em morte celular por apoptose após 15 horas de infecção.

Continuando o estudo *in vitro* aqui proposto e desenvolvido, e após confirmação do aumento da produção de ERO em células Vero infectadas pelo MAYV e da ação antioxidante da Silimarina, N-acetilcisteína, Fulerol, Quercetina e Rutina, continuamos os experimentos a fim de responder nossos questionamentos: as ERO podem de alguma forma favorecer a multiplicação do MAYV? Ou seja, um ambiente celular redox alterado, no qual os oxidantes predominam, pode favorecer de alguma forma a expansão e propagação do vírus? Se sim, qualquer substância antioxidante capaz de detoxificar o excesso de ERO e restabelecer a homeostase redox pode indiretamente diminuir a multiplicação do MAYV? Para isto, o

próximo passo foi averiguar se os compostos antioxidantes utilizados seriam capazes de agir como antivirais, mantendo a viabilidade celular e inibindo a produção de vírus. Desta forma, a Silimarina foi utilizada como controle, uma vez que nosso grupo de estudo já havia descrito a ação antioxidante e antiviral deste composto em células HepG2 infectadas com o MAYV (CAMINI et al., 2018) e também em camundongos infectados (FERRAZ et al., 2021).

Como resultado, nós demonstramos que a Silimarina foi o único composto que apresentou atividade antiviral significativa contra o MAYV em células Vero, protegendo-as contra a morte celular 48hpi. A próxima etapa então foi titular os sobrenadantes para quantificar a produção de vírus na presença e ausência dos antioxidantes. Foram coletadas amostras nos tempos de 24 e 48hpi. Mesmo após 24hpi, as células infectadas e tratadas com NAC, Fulerol, Quercetina e Rutina apresentavam efeito citopático marcante, onde já era possível ser constatada pontos de morte celular. Somente a Silimarina manteve as características celulares semelhantes às células controles. No tempo de 24hpi, a Silimarina foi capaz de reduzir a quantidade de vírus produzido em quase 2 unidades logarítmicas, enquanto a NAC reduziu aproximadamente em 1 unidade logarítmica. No tempo de 48hpi, somente a Silimarina reduziu produção de vírus também em quase 2 unidades logarítmicas, enquanto os outros compostos, incluindo a NAC, não tiveram efeito.

Em conjunto, nossos resultados nos levam a hipótese de que a ação anti-MAYV já bem documentada da Silimarina não está diretamente relacionada a sua ação antioxidante, provavelmente é um efeito benéfico adicional do composto. Assim, nem todo composto antioxidante tem ação antiviral, e que mesmo que se iniba a formação de ERO, reduzindo-a ao nível basal, isto por si só não é o suficiente em inibir a multiplicação do MAYV. Em outras palavras, a produção intracelular de ERO frente a infecção viral não parece ter ligação direta a multiplicação do MAYV em células Vero.

Em um trabalho de revisão, Reshi et al. (2014) descrevem que o estresse oxidativo via infecções por vírus de RNA pode contribuir para vários aspectos da patogênese da doença, incluindo apoptose, perda da função imunológica, multiplicação viral e resposta inflamatória. Além disso, as ERO podem desempenhar um papel importante como uma molécula de sinal na regulação da multiplicação viral. No entanto, o quanto as ERO interferem na multiplicação do vírus ainda não está completamente elucidado e parece depender da espécie de vírus e do tipo celular infectado. Nossa pesquisa indica que a multiplicação do MAYV em células Vero parece não ser diretamente influenciada pela produção de ERO, uma vez que mesmo quando

utilizamos compostos antioxidantes para reduzir detoxificar o excesso destas espécies, o vírus foi capaz de multiplicar alcançando elevados títulos.

Um estudo utilizando a Silimarina também já foi executado com outro *Alphavirus* relacionado ao MAYV, o *Chikungunya virus* (CHIKV). Lani et al. (2015) demonstraram que a Silimarina exibiu importante atividade antiviral *in vitro* contra o CHIKV. Ela suprimiu significativamente os estágios pós-entrada da infecção viral, mais provavelmente a replicação do RNA de CHIKV. De forma coerente, a expressão de proteínas necessárias para a replicação do RNA, e também a expressão da proteína E2 estrutural viral foram reguladas negativamente. Ainda, em um trabalho feito por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrada *in vitro* uma potente ação antiviral da Silimarina contra o *Zika virus* (ZIKV) em células Vero (Silva, et al., 2020).

Os demais compostos empregados neste trabalho também já foram utilizados na literatura científica em estudos envolvendo vírus. De acordo com Cavalheiro et al. (2016), em macrófagos infectados com MAYV, o tratamento com NAC reduziu a liberação do fator de necrose tumoral (TNF) pelas células infectadas a níveis basais. Esse achado é importante já que TNF está relacionado à patogênese de Febre Mayaro, uma vez que promove o processo inflamatório característico da artrite, um sintoma convalescente da doença, que muitas vezes acompanha o indivíduo durante meses após a infecção. Recentemente, Pereira et al. (2021) mostraram que o Fulerol foi capaz de inibir a formação de ERO após a infecção pelo ZIKV em células de glioblastoma humano (U-87MG) e também inibiu a multiplicação viral em até 90%. Em relação a Quercetina e Rutina, Savov et al. (2006) constataram que o pré-tratamento com ambos os flavonóides (20mg/kg) restaura o dano oxidativo no fígado de camundongos ICR infectados com o vírus Influenza. Ainda, Silva et al. (2011) sugeriram que a Quercetina e Rutina, em células C6/36, têm potencial para o desenvolvimento de um agente anti-DENV.

Santos et al. (2014), conduziram um trabalho onde foi demonstrada atividade anti-MAYV em células Vero. Neste estudo, eles utilizaram folhas de espécimes silvestres de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. Os componentes utilizados no estudo foram extraídos das folhas secas ao ar em pó, com MeOH à temperatura ambiente durante 7 dias. As frações de quercetina, EtOAc e n-BuOH demonstraram inibir a replicação do vírus MAYV, a depender da dose, com mais de 95% de inibição a 25 µg/mL. EtOAc e nBuOH continham uma mistura de cinco flavonóides, incluindo quercetina e seus derivados glicosídeos (guaijaverina, quercitrina, isoquercitrina e hiperina, em diferentes proporções). Claramente, nosso estudo

obteve um resultado diferente. É importante destacar que Santos et al. (2014), utilizaram MOI de 0,1 em seus estudos, em um ensaio antiviral de 24 horas. A cepa do vírus também foi diferente. Neste estudo, utilizamos a cepa Acre27 (número de acesso ao GenBank KM400591), que foi originalmente isolado em junho de 2004 durante uma pesquisa epidemiológica a partir de amostra de sangue de uma paciente febril e malária negativo de Acrelândia – Bacia Amazônica, Acre, Brasil. Santos et al. (2014) utilizou vírus isolado de um paciente de Trinidad e Tobago (ATCC VR-66, cepa TR 4675). Adicionalmente, é possível que após as primeiras 24 horas, o efeito da quercetina não fosse o mesmo, bem como uma MOI maior, como a utilizada por nosso estudo, demonstrasse resultados diferentes. A ciência é limitada e contingente porque lida com contingências. A análise de ambos estudos demonstra circunstâncias diferentes e não se tratam de verdades absolutas e definitivas. Portanto, este atual trabalho e o de Santos et al. (2014) são igualmente importantes e não se excluem.

Por fim, o presente trabalho nos ajuda a responder nossa pergunta inicial e sugere que a multiplicação do MAYV em células Vero não sofre interferência das ERO, uma vez que reduzindo essas espécies através do tratamento com vários antioxidantes (exceto a Silimarina), a produção de partículas infecciosas não foi inibida. Em conjunto, nossos resultados constituem um avanço sobre os conhecimentos envolvendo o papel que as ERO têm durante à infecção pelo MAYV e reforçam os papéis benéficos da Silimarina em reduzir o a produção de ERO, o estresse oxidativo e a multiplicação do MAYV, dados esses já demonstrados *in vitro* (CAMINI et al., 2018) e *in vivo* (FERRAZ et al., 2021) por nosso grupo.

O papel fisiológico desempenhado pelas ERO é importante porque os vírus, como parasitas intracelulares obrigatórios, dependem dos mecanismos biossintéticos de suas células hospedeiras. Ainda, a ativação da produção de ERO em infecções virais pode desempenhar um papel na geração de sintomas e patologias. Por exemplo, a toxicidade e reatividade das ERO, que são produzidas em quantidades excessivas nas células onde os vírus multiplicam, pode levar a reações exageradas das respostas imunológicas contra os órgãos ou tecidos, o que pode explicar os mecanismos de lesão observados nas diferentes doenças virais. Portanto, o principal desafio para os virologistas é entender as funções fisiopatológicas das ERO, que proporcionaria uma compreensão profunda de muitos aspectos das doenças virais infecciosas. Nesse trabalho, não encontramos uma relação direta entre a inibição de ERO e o efeito anti-

MAYV dos antioxidantes NAC, Fulerol, Querceina e Rutina. No entanto, outras questões importantes relacionadas à infecção pelo MAYV, como o estresse oxidativo e a inflamação, merecem ser avaliadas utilizando esses e outros antioxidantes, fazendo parte das perspectivas desse trabalho.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na execução deste estudo mostraram o aumento da produção de ERO após a infecção pelo MAYV em células Vero e a ação antioxidante dos compostos Silimarina, N-acetilcisteína, Fulerol, Quercetina e Rutina. No entanto, com o avanço da infecção *in vitro*, somente a Silimarina foi capaz de agir como um antiviral, mantendo a viabilidade celular alta e inibindo significativamente a produção de partículas viárias infecciosas. Já a NAC, o Fulerol, a Quercetina e a Rutina não foram capazes de proteger a célula contra a morte celular causada pelo vírus nem reduzir a produção de partículas virais 48hpi. Estes resultados sugerem que a multiplicação do MAYV não é necessariamente favorecida pela produção de ERO, uma vez que a inibição ou detoxificação dessas espécies não foi capaz de inibir a multiplicação viral, exceto para a Silimarina, o que confirma suas ações antioxidantes e antivirais específicas. Estudos adicionais devem ser realizados para caracterizar o mecanismo pelo qual a Silimarina exerce sua ação antiviral contra o MAYV e como os antioxidantes em geral, ao inibirem ERO, podem atuar de forma benéfica em outros processos desencadeados pela infecção que contribuem para o desenvolvimento da doença, como o estresse oxidativo e a inflamação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes & Infections*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018.

AFANAS I.B., et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.*, v. 38, n. 11, p. 1763-9, 1989.

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

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

ALDINI, G. et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why, *Free Radical Research*, v. 52 n. 7, p 751-762, 2018.

ALMEIDA L. T. et al. Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme T activities *in vitro* and *in vivo*. *Virus Res*, v. 286, 2020.

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

BAKRY, R. et al. “Medicinal applications of fullerenes.” *International journal of nanomedicine*, v. 2, n. 4, p. 639-649, 2007.

BAGHEL, Satyendra, et al. A review of quercetin: Antioxidant and anticancer properties. *World J Pharm Pharmaceutical Sci*, v.1, n.1, p. 146 – 160, 2012.

BARREIROS A. L. B. S., DAVID J. M., DAVID J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEHLING, E. B., et al. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. *Alim. Nutr.*, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, v. 5, n. 1, p. 19, 2012.

BISCHOFF, S. C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 11, n. 6, p. 733-740, 2008.

BOOTS, A.W., HAENEN, G.R.M., BAST, A. Health Effects of Quercetin: From Antioxidant to Nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, v. 585, p. 325-337, 2008.

BROWN L. A. Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am J Physiol*, v. 266, L172-7, 1994.

CAETANO, C. C. et al. Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress is Associated With Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 15289, 2019.

CAI H., HARRISON D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role oxidant stress. *Cir Res*, v. 87, p. 840-844, 2000.

CAMINI F. C., COSTA D. C. Silymarin: not just another antioxidant. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, p. 1-12, 2020.

CAMINI, F. C. et al. Oxidative stress in Mayaro virus infection. *Virus Research*, v. 236, p. 1–8, 2017.

CAMINI, F. C. et al. Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral Research*, v. 158, p. 8–12, 2018.

CAVALHEIRO, M. G. et al. Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, p. 1485–1499, 2016.

CAUSEY O.R., MAROJA O.M. Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. *Am J Trop Med Hyg*, v. 6, p. 1017-23, 1957.

CHAABI, M. Antiviral effects of quercetin and related compounds. *Naturopathic Currents*, Special Edition, 2020.

CHEN, H. et al. Anti-tumor effect of rutin on human neuroblastoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. *Scientific World Journal*, 2013.

CHENG, Z. et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by quercetin in human hepatoma cell lines. *Virologica Sinica*, v. 30, p. 261–268, 2015.

CHOI, G.N. et al. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chemistry*, v. 132, n. 2. p. 1019- 1024, 2012.

CHOUIN-CARNEIRO, T., DOS SANTOS, F. B. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. *Biological Control of Pest and Vector Insects*, Chapter 11, 2017.

COSTANTINI D. Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. *J Exp Biol*, v. 222, n. 13, jeb194688, 2019.

DA SILVA, R.R. et al. Hypocholesterolemic effect of naringin and rutin flavonoids. *Archivos latinoamericanos de nutrici n*, v. 51, n. 3, p. 258–264, 2001.

DE ARAÚJO G.R., et al. Baccharis trimera inhibits reactive oxygen species production through PKC and down-regulation p47 phox phosphorylation of NADPH oxidase in SK Hep-1 cells. *Exp Biol Med* (Maywood), v. 242, n. 3, p. 333-343, 2017

DENEKE S. M., FANBURG B. L. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*, v. 257, L163-73, 1989.

DIAS, D. T. M. et al. Rutin inhibits the in vitro formation of advanced glycation products and protein oxidation more efficiently than quercetin. *Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicadas – Rcfba*, v. 42, p. 718, 2021.

DROGE W., ECK H. P., MIHM S. Oxidant-antioxidant status in human immunodeficiency virus infection. *Methods Enzymol*, v. 233, p. 594-601, 1994.

EZERINA, D. et al. N-Acetyl Cysteine Functions as a Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H₂S and Sulfane Sulfur Production. *Cell Chemical Biology*, v. 25, n. 4, p. 447-459, 2018.

EVANS M. D., CHURCH D. F., PRYOR W. A. Aqueous cigarette tar extracts damage human α -1-proteinase inhibitor. *Chem Biol Interact*, v. 79, p. 151-164, 1991.

FAN, D. et al. Anti-inflammatory, antiviral and quantitative study of quercetin-3-O- β -D glucuronide in *Polygonum perfoliatum* L. *Fitoterapia*. v. 82, n. 6, p. 805-10, 2011.

FERNANDES, A. A., et al. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 64, n. 3, p. 214–219, 2010.

FIGUEIREDO, Mario Luis Garcia de; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Emerging alphaviruses in the Americas: chikungunya and mayaro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 6, p. 677-683, 2014.

FLOHÉ L., GUNZLER W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, v. 104, p. 114-21, 1984.

FRASCHINI F., DEMARTINI G., ESPOSTI D. Pharmacology of silymarin. *Clin. Drug Invest*, v. 22, n. 1, p. 51-65, 2002.

GANESHPURKAK, A. SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. *Pharmaceutical Journal*, v. 25, n. 2, p. 149-164, 2017.

GANJIAN, N., RIVIERE-CINNAMOND, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 44, p. 1, 2020.

GEILER, J. et al. N-acetyl-l-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, n. 3, p. 413-420, 2010.

GERAETS, L. et al. Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *The Journal of nutrition*, v. 137, n. 10, p. 2190–2195, 2007.

GLOIRE, G., LEGRAND-POELS, S., PIETTE, J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, n. 11, p. 1493-1505, 2006.

GONÇALVES, C.F. et al. Flavonoid rutin increases thyroid iodide uptake in rats. *PLoS One*, v. 8, n. 9, e73908, 2013.

IBRAHIM, A.K. et al. AntiH5N1 virus flavonoids from *Capparis sinaica* Veill. *Natural product research*, v. 27, n. 22, p. 2149–2153, 2013.

HALEAGRAHARA, N.; SIES, C.J.; PONNUSAMY, K. Effect of quercetin and desferrioxamine on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced neurotoxicity in striatum of rats. *The Journal of toxicological sciences*, v. 38, n. 1, p. 25–33, 2013.

HALLIWELL B., CROSS C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, v. 102, n. 2, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 4th Edition, Oxford University Press, New York, 2007.

HALSEY, E. S. et al. Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 11, p. 1-2, 2013.

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

HERTOG, M.G. et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and cancer*, v. 20, n.1, p. 21–29, 1993.

HOCH A.L. et al. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. *Am J Trop Med Hyg*, v. 30, n. 3, p. 689–698, 1981.

HOLLMAN, P. C. H.; HERTOG, M. G. L.; KATAK, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 57. n. 1, p. 43-46, 1996.

HOSAKOTE Y. M. et al. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 41, n. 3, p. 348-357, 2009.

HUANG S. H. et al. Inhibitory effect of melatonin on lung oxidative stress induced by respiratory syncytial virus infection in mice. *J Pineal Res Mar*, v. 48, n. 2, p. 109-116, 2010.

JACKSON, A. C. et al. Role of Oxidative Stress in Rabies Virus Infection of Adult Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons, *Journal of Virology*, v. 84, n. 9, 2010.

JAVED, H. et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience*, v. 17, p. 340–352, 2012.

JEONG, J.H. et al. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of cellular biochemistry*, v.106, n.1, p. 73–82, 2009.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, v. 8, p. 1–16, 2006.

JORDÃO Jr A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina*, v. 31, n. 3, p. 434-449, 1998.

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

KANASHIRO, A. et al. Modulatory effects of rutin on biochemical and hematological parameters in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 81, n.1, p. 67–72, 2009.

KIM, D.W., et al. Germinated Buckwheat extract decreases blood pressure and nitrotyrosine immunoreactivity in aortic endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy research*, v. 23, n. 7, p. 993–998, 2009.

KHAN, M. M. et al. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. *Brain research*, v. 1292: 123-35, 2009.

KNEKT, P. et al. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *European journal of clinical nutrition*, v. 54, n. 5, p. 415–417, 2000.

KNEKT, P. et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American journal of epidemiology*, v. 146, n. 3, p. 223-30, 1997.

KREFT, S., KNAPP, M., KREFT, I. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 47, n. 11, p. 4649–4652, 1999.

KUMAR S., PANDEY A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1-16, 2013.

LADEIRA, M. S. Nanotecnologia aplicada ao sistema cardiovascular. Efeito do fulerol no estresse oxidativo. (Tese). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, 2016.

LANI R. et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Sci. Rep*, v. 5, p. 11421, 2015.

LIM, Hee-Jung et al. Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of ZIKA virus and their structure activity relationship. *Biotechnology letters*, v. 39, n. 3, p. 415-421, 2017.

LIN, J.P. et al. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environmental toxicology*, v. 27, n. 8, p. 480–484, 2012.

LIU C. H. et al. Antiviral Activities of Silymarin and Derivatives. *Molecules*. 2019;24(8):1552. Published 2019 Apr 19. doi:10.3390/molecules24081552

LOWE, Rachel et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.15, n. 96, p. 1-18, 2018.

MAALIK, A. et al. Pharmacological Applications of Quercetin and Its Derivatives: A Short Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.13, n.9, p. 1561-1566, 2014.

MACHADO, D.G. et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *European journal of pharmacology*, v. 587, n. 1–3, p. 163–168, 2008.

MACIEL, R. M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Research in veterinary science*, v. 95, n. 2, p. 389–397, 2013.

MACKAY I. M., A K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? *Microbes Infect*, v. 18, n. 12, p. 724–734, 2016.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. The American journal of clinical nutrition, v. 81, n.1 Suppl, p. 230S–242S, 2005.

MASTERS C., PEGG M., CRANE D. On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol Cell Biochem*, v. 70, p.113-120, 1986.

MAURYA, A.K.; VINAYAK, M. Modulation of PKC signaling and induction of apoptosis through suppression of reactive oxygen species and tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1): key role of quercetin in cancer prevention. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, v. 36, n.11, p. 8913–8924, 2015.

MEISTER A., ANDERSON M. E. Glutathione. *Annu Rev Biochem*, v. 45, p. 711-760, 1983.

MORETTI, E. et al. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), v. 34, n. 4, p. 651–657, 2012.

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

NANDI A. et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2019, p. 9613090, 2019.

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

NIJVELDY, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

NIEOCZYM, D. et al. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 54, p.50–58, 2014.

NIZER, W. et al. Lack of Activity of Rutin Isolated from *Tontelea micrantha* Leaves Against Vero and BHK, Fungi, Bacteria and Mayaro Virus and its In Silico Activity. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, v.11, n.1, p. 9-14, 2020.

NONES, J. et al. The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. *Cell and tissue research*, v. 350, n. 2, p. 305–315, 2012.

NUNES, M. R. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*, v. 13, p. 102, 2015.

PAMPLONA R., COSTANTINI D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 301, n. 4, p. 843-863, 2011.

Pan American Health Organization / World Health Organization. *Epidemiological Alert: Mayaro fever*. Washington, D.C.: PAHO/WHO, 2019.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recent advances. *Fitoterapia, Amsterdam*, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.

PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. *Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.*

PEREIRA, S. H. et al. Antioxidant and antiviral activity of fullerol against Zika virus. *Acta Tropica*, v. 224, p. 106135, 2021.

PERRY J. J. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Review. Biochimic Biophys Acta*, v. 1804, p. 245-262, 2010.

POLYAK S. J., FERENCI P., PAWLOTSKY J. M. Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, v. 57, n. 3, p. 1262-71, 2013.

POLYAK S. J. et al. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proc Natl Acad Sci*, v. 107, n. 13, p. 5995-5999, 2010.

POWERS, A. M. et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. *Am J Trop Med Hyg*, v. 75, p. 461–469, 2006.

QIU X. et al. Prophylactic Efficacy of Quercetin 3- β -O-d-Glucoside 80 against Ebola Virus Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 60, n. 9, p. 5182–5188, 2016.

RAINONE, F. D.O., PH.D., M.S. Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, Bronx, New York *Am Fam Physician*, v. 72, n. 7, p. 1285-1292, 2005.

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

RESHI M. L., SU Y. C., HONG J. R. RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *Int J Cell Biol*, 2014.

ROJAS, Á. et al. Effect of Quercetin on Hepatitis C Virus Life Cycle: From Viral to Host Targets. *Sci Rep*, v. 6, 31777, 2016.

RUSSO, M. et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical pharmacology*, v. 83, n. 1, p. 6–15, 2012.

SANTOS, F. M. et al. Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 5, p. 7375, 2019.

SANTOS, A.E., et al. Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity. *Parasites Vectors*, v. 7, n. 130, 2014.

SIES, H., CADENAS, E. Oxidative Stress: Damage to Intact Cells and Organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 311, n. 1152, p. 617-631, 1985.

SIES H., MOSS K. M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur J Biochem*, v. 84, n. 2, p. 377-383, 1978.

SHI, Z.; PUYO C. A. N-Acetylcysteine to Combat COVID-19: An Evidence Review. *Ther Clin Risk Manag*, v. 16, p. 1047-1055, 2020.

SONG, J., YOUNGHWA, K., JUNSOO, L. Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activity of quercetin, isoquercitrin and rutin against alcohol-induced liver injury in HepG2 Cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 32, n. 1, 2018.

SONG, J.H.; SHIM, J.K.; CHOI, H.J. Quercetin 7-rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral induced reactive oxygen species. *Virology journal*, v. 8, n. 460, 2011.

STEFEK, M., KARASU, C. Eye lens in aging and diabetes: effect of quercetin. *Rejuvenation research*, v. 14, n. 5, 525–534, 2011.

SRINIVASAN, K.; KAUL, C.L.; RAMARAO, P. Partial protective effect of rutin on multiple lowdose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 37, n. 5, p. 327–328, 2005.

SWARAN, F. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2. p. 191-206, 2009.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nat Rev Rheumatol*, v. 8, p. 420–429, 2012.

TAO, J. et al. In vitro anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. *Antiviral Research*, v. 75, n. 3, p. 227–233, 2007.

- TONGJAROENBUANGAM, W. et al. Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. *Neurochemistry international*, v. 59, p. 677–685, 2011.
- TOKLU H. Z. et al. Silymarin, the Antioxidant Component of *Silybum marianum*, Prevents Sepsis-Induced Acute Lung and Brain Injury. *J Surg Res*, v. 145, n. 2, p. 214-222, 2008.
- TREITINGER, A., et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine on lymphocyte apoptosis, lymphocyte viability, TNF-alpha and IL-8 in HIV-infected patients undergoing anti-retroviral treatment. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 8, n. 5, p. 363-371, 2004.
- UCHIDE, N., TOYODA, H. Antioxidant therapy as a potential approach to severe influenza-associated complications. *Molecules*, v. 6, n. 3, p. 2032–2052, 2011.
- VALKO M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, v. 160, p. 1-40, 2006.
- WANG, L. et al. Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice. *European journal of pharmacology*, v. 690, n. 1-3, p. 133–141, 2012.
- WEAVER, S.C.; BARRETT, A. D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol*, v. 2, n. 10, p. 789-801, 2004.
- WEAVER, S. C., REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*, v. 85, n. 2, p. 328-364, 2010.
- ZANDI K. et al. In vitro antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against dengue virus type-2. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5, n. 85 p. 5534–5539, 2011.
- ZHANG Z., RONG L., LI Y. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. *OxidMed Cell Longev*, v. 2019, 1409582, p. 1-17, 2019.

ZHANG Y. et al. Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. *Int J InfectDis*, v. 24, p. 30-36, 2014.

ANEXOS

Verifique o código de autenticidade 4038227.2899823.288594.5.3095575988505996826 em <https://www.even3.com.br/documentos>



**VIII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG –
CONECTA SIM 2021**



Certificado de Submissão

Certificamos que o trabalho AVALIAÇÃO DO PAPEL DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS MAYARO com autoria de Leticia Maria Silva, Ariane Coelho Ferraz, Rafaela Lameira Souza Lima e Cintia Lopes de Brito Magalhães foi submetido e aprovado na modalidade de Resumo no “VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2021



Dr. Daniel de Assis Santos
Coordenador do Conecta SIM 2021



Dra. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - UFMG

