



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



GIOVANA MESQUITA OLIVEIRA DE CASTRO DOMINGOS

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTIVIRAL DA SILIMARINA
CONTRA O VÍRUS MAYARO EM CÉLULAS VERO**

Ouro Preto

2024

GIOVANA MESQUITA OLIVEIRA DE CASTRO DOMINGOS

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ANTIVIRAL DA SILIMARINA
CONTRA O VÍRUS MAYARO**

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências Exatas e Biológicas – Departamento de Ciências Biológicas – da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães

Coorientadora: Ariane Coelho Ferraz

Área de Concentração: Microbiologia

Ouro Preto

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

D671a Domingos, Giovana Mesquita Oliveira de Castro.

Avaliação dos mecanismos de ação antiviral da silimarina contra o vírus Mayaro em células Vero. [manuscrito] / Giovana Mesquita Oliveira de Castro Domingos. - 2024.

35 f.: il.: color., gráf..

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

Coorientadora: Dra. Arianne Coelho Ferraz.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas .

1. Microbiologia. 2. Virologia. 3. Agentes antivirais. I. Magalhães, Cíntia Lopes de Brito. II. Ferraz, Arianne Coelho. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 579

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Giovana Mesquita Oliveira de Castro Domingos

Avaliação dos mecanismos de ação antiviral da silimarina contra o vírus Mayaro em células Vero

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo

Aprovada em 30 de setembro de 2024

Membros da banca

Dra Cintia Lopes de Brito Magalhães - Orientador(a) (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra Marília Bueno da Silva Menegatto (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra Adriana Cotta Cardoso Reis - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Cintia Lopes de Brito Magalhães, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 18/10/2024



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Lopes de Brito Magalhaes, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/10/2024, às 16:43, 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 **0797731** e o código CRC **87C2EB95**.

AGRADECIMENTOS

Chegar ao término desta etapa foi uma experiência desafiadora e gratificante, e não teria sido possível sem o apoio de várias pessoas. Agradeço, primeiramente, à Deus, por me dar forças e sabedoria ao longo deste caminho. À minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo suporte incondicional e compreensão nos momentos mais difíceis. Em especial, agradeço a minha mãe Ana Paula e meu pai Carlos pelo carinho, paciência, investimento e incentivo constantes. Aos meus irmãos Mariana e Matheus, por sempre acreditarem em mim e serem os melhores amigos que eu poderia ter. Aos meus amiguinhos Cacau, Theo e Pantufa, que fazem a minha vida ser mais leve e feliz. À minha orientadora Cíntia, por sua dedicação, orientação e disponibilidade ao longo de toda a pesquisa. E principalmente por confiança em mim para o desenvolvimento desse projeto tão importante. À minha Co-orientadora Ariane, por ter me ensinado tudo desde o início e ser meu maior apoio. À Marília, que nunca mediu esforços para me ajudar mesmo quando eu pedia ajuda para ela num domingo à noite, sou muito grata por tudo. À toda equipe LBTM, principalmente, Maria Clara, Mariana, Pedro e João, por todo o companheirismo. À Maria Laura e Larissa que estiveram comigo desde o início. Às minhas garotas da biologia, em especial: Laura, Mari, Sofia e Iara. À minha duplinha inseparável Lud. Ao Luiz e Elder, por deixarem meus dias no Iceb mais divertidos. Agradeço a UFOP e à toda equipe de professores do DCBI, pelo ensino gratuito de qualidade. Ao CNPQ, pelo financiamento e suporte durante todos esses anos de pesquisa. À todos amigos que fiz em Ouro Preto, que transformaram minha vida. E por fim, agradeço a minha casa Paraíso, pelo apoio incondicional e irmandade durante esses quatro anos de graduação. Em especial à: Navalha, Kiubiu, Xapolin, Konká, Romi, Pergunts, Mini e Xapéu.

RESUMO

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus causador de febre aguda e artralgias incapacitantes e duradouras em humanos. No Brasil, a Febre Mayaro era tida como endêmica da região Amazônica, porém, nos últimos anos, os surtos de MAYV aumentaram consideravelmente nas metrópoles e sua presença no sudeste do Brasil foi identificada recentemente. Além disso, o potencial do mosquito *Aedes aegypti* em transmitir o MAYV contribui para que o vírus possa instalar um ciclo urbano em um futuro próximo. A Febre Mayaro é uma doença negligenciada e subnotificada, sem tratamento ou vacina até o momento. Nesse sentido, visto a emergência do MAYV, nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a estudar a ação do fitoterápico silimarina contra o MAYV, tanto *in vitro* como *in vivo*. Além de inibir o MAYV em ambos os modelos, também foi demonstrado que a silimarina possui ação hepatoprotetora, antioxidante e anti-inflamatória, protegendo os animais dos danos causados pelo MAYV, principalmente no fígado. Contudo, apesar dos avanços em vários aspectos no estudo da atividade anti-MAYV da silimarina, o mecanismo pelo qual ela inibe o vírus ainda não havia sido avaliado. Dessa forma, dando continuidade ao trabalho, o objetivo deste estudo foi avaliar o mecanismo de ação antiviral da silimarina em células infectadas por MAYV. Para isso, foram realizados experimentos em que a silimarina foi adicionada em diferentes momentos do ciclo de multiplicação viral, a fim de avaliar se a atividade antiviral observada anteriormente seria decorrente da inibição da etapa de adsorção, penetração ou mesmo após a infecção das células pelo MAYV, além da avaliação da existência de atividade virucida. Ao final dos ensaios, observou-se que a silimarina não apresenta atividade virucida, nem tem ação durante as etapas de adsorção e penetração. O principal mecanismo de ação antiviral da silimarina contra o MAYV ocorre na etapa pós-infecção, no qual foi observado uma redução significativa em todos os tempos de tratamento, mesmo quando iniciado 24 horas pós-infecção. Assim, este trabalho agrega mais informações sobre a caracterização do mecanismo de ação antiviral da silimarina contra o MAYV, contribuindo para o desenvolvimento de uma possível abordagem farmacológica contra a Febre Mayaro, que até então não possui um tratamento específico.

ABSTRACT

Alphavirus Mayaro (MAYV) is an arbovirus that causes acute fever and debilitating, long-lasting arthralgias in humans. In Brazil, Mayaro fever was once considered endemic to the Amazon region; however, in recent years, MAYV outbreaks have significantly increased in metropolitan areas, and its presence in southeastern Brazil has been recently identified. Furthermore, the potential of the *Aedes aegypti* mosquito to transmit MAYV contributes to the possibility of the virus establishing an urban cycle in the near future. Mayaro fever is a neglected and underreported disease, with no treatment or vaccine available so far. In this context, given the emergence of MAYV, our research group has been dedicated to studying the effects of the herbal compound silymarin against MAYV, both in vitro and in vivo. In addition to inhibiting MAYV in both models, it has also been demonstrated that silymarin possesses hepatoprotective, antioxidant, and anti-inflammatory properties, protecting animals from MAYV-induced damage, particularly in the liver. However, despite advances in various aspects of the study of silymarin's anti-MAYV activity, the mechanism by which it inhibits the virus had not yet been evaluated. Thus, continuing this work, the objective of this study was to evaluate the antiviral mechanisms of action of silymarin in MAYV-infected cells. To this end, experiments were conducted in which silymarin was added at different stages of the viral replication cycle to assess whether the previously observed antiviral activity was due to the inhibition of adsorption, penetration, or even after the infection of cells by MAYV, as well as evaluating the potential for virucidal activity. At the end of the assays, it was observed that silymarin does not exhibit virucidal activity nor has an effect during the adsorption and penetration stages. The main antiviral mechanism of action of silymarin against MAYV occurs in the post-infection stage, where a significant reduction in viral replication was observed at all treatment times, even when initiated 24 hours post-infection. Therefore, this study provides further insight into the characterization of silymarin's antiviral mechanism of action against MAYV, contributing to the development of a possible pharmacological approach for Mayaro fever, which currently lacks a specific treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência do vírus Mayaro no Brasil e na América do Sul.....	9
Figura 2 - Diferença do ciclo urbano e ciclo silvestre das arboviroses e seus vetores.....	10
Figura 3 - Microscopia eletrônica e Estrutura Tridimensional do MAYV	14
Figura 4 - Ciclo de Multiplicação de um Alfavírus	15
Figura 5 - Processo da planta ao extrato de <i>Silybum marianum</i>	16
Figura 6 - Determinação da concentração de uso da silimarina para os ensaios de mecanismo de ação	22
Figura 7 - Silimarina não apresenta atividade Virucida contra o MAYV	23
Figura 8 - Silimarina não apresenta atividade na etapa de adsorção contra o MAYV.....	24
Figura 9 - Silimarina não apresenta atividade na etapa de penetração contra o MAYV.....	25
Figura 10 - Silimarina apresenta atividade antiviral contra o MAYV na etapa pós-infecção.	26

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CHIKV- *Alphavirus*

Chikungunya

CMC – Carboximetilcelulose

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

EV-A71 – Enterovirus 71

FM – Febre Mayaro

HBC – Hepatite B

HCV – Hepatite C

hpi – Horas pós-infecção

MAYV – *Alphavirus mayaro*

Moi – Multiplicidade de infecção

mRNA – RNA mensageiro

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

ORF – Open Reading Frame

PBS – Tampão Fosfato

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real SFB – Soro Fetal Bovino

UFP – Unidade Formadora de Placa

ZIKV – Zika Virus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 A FEBRE MAYARO.....	8
1.1.1 Epidemiologia	8
1.1.2 Patogenia	11
1.1.3 Diagnóstico, Tratamento e Profilaxia	11
1.2 O VÍRUS	12
1.2.1 Família <i>Togaviridae</i> : Gênero <i>Alphavirus</i>	12
1.2.2 Genoma e Estrutura do Vírion	13
1.2.3 Ciclo de Multiplicação.....	14
1.3 PLANTAS COMO FONTE FITOTERÁPICA.....	15
1.3.1 <i>Silybum marianum</i>	16
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGIA	18
4.1 Células, vírus e composto.....	18
4.2 Avaliação de Atividade Virucida	18
4.3 Avaliação de atividade antiviral na Etapa de Adsorção	19
4.4 Avaliação de atividade antiviral na etapa de penetração	20
4.5 Avaliação da atividade antiviral em etapas precoces e tardias do ciclo de multiplicação do vírus	20
4.6 Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Estoque Viral	22
5.2 . Determinação da concentração do composto	22
5.3. Análise da atividade antiviral na Etapa Virucida	23
5.4. Análise da atividade da etapa de adsorção.....	24
5.5. Análise da atividade antiviral na etapa de penetração	24
5.6. Análise de atividade antiviral em etapas precoces e tardias do ciclo de multiplicação do vírus	25
6. DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 A FEBRE MAYARO

1.1.1 Epidemiologia

Causada pelo MAYV, a Febre Mayaro é uma doença viral infecciosa que provoca febre aguda autolimitada em pessoas infectadas, característica comum entre muitas arboviroses. Apesar de ser um vírus antigo, o MAYV é pouco diagnosticado, principalmente por apresentar um quadro clínico semelhante a Dengue, Chikungunya e Zika, sobretudo na fase aguda da doença, onde os sintomas são inespecíficos (Calisher, 1994, Vieira et al., 2015).

Os dados epidemiológicos da doença são escassos, tanto pela insuficiência de supervisão nas áreas endêmicas como também pelo aspecto generalizado das manifestações clínicas que se assemelham muito as outras arboviroses e a falta de um sistema de diagnóstico eficaz (Weise et al., 2014). Entretanto, em maio de 2019, a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) emitiu um boletim alertando sobre o aumento da incidência de Febre Mayaro, incentivando os Estados membros a implementar meios de capacitação para diagnóstico da doença e sensibilização de profissionais de saúde para o entendimento do vírus e sua patologia (OPAS, 2019).

O MAYV foi isolado pela primeira vez em 1954 na cidade de Mayaro, em Trinidad e Tobago, a partir do sangue de cinco pacientes sintomáticos, quatro dos quais eram trabalhadores rurais (Anderson et al., 1957). No entanto, uma pesquisa de 1973 mostrou a presença do MAYV na América tempos antes, em soro de pacientes coletados durante a construção de canais no Panamá e Colômbia entre 1904 e 1910 (Srihongse; Stancy; Gauld, 1973). O inaugural registro de Febre Mayaro no território brasileiro ocorreu durante uma epidemia em uma localidade rural situada em Belém no estado do Pará, em 1955 (Aitken et al., 1960). Posteriormente, em 1977, um surto de MAYV afetou aproximadamente 20% da população de Belterra, também localizada no estado do Pará (Causey, Maroja, 1957).

Em uma pesquisa de revisão bibliográfica realizada por Barros et al. (2021) sobre a epidemiologia do MAYV na América Latina nos anos de 2009 a 2019, a literatura sinalizou a presença do vírus em diferentes países, como: Colômbia, Haiti, México, Panamá, Argentina, Peru, Uruguai, Venezuela, Brasil, Equador, Bolívia, Guatemala e Honduras.

No caso do Brasil, o país se destaca por ter clima tropical e possuir uma grande biodiversidade. Nesse contexto, o vírus era identificado como endêmico da região Amazônica, onde sua presença se limitava a mamíferos silvestres ou pessoas que viviam próximas a zonas florestais, distantes dos centros urbanos (Azevedo et al., 2009). A presença do vírus era relatada predominantemente nas regiões Centro-Oeste e Norte (Zuchi et al., 2014).

Contudo, um estudo realizado por Lorenz et al. (2019) mostrou que a presença do MAYV está intimamente ligada a fatores como o tipo de bioma, densidade populacional, precipitação anual, taxa anual de vapor e altitude. O bioma Cerrado, no Brasil, mostrou-se particularmente associado à ocorrência do MAYV, possivelmente devido às características do ciclo de vida do vetor *Haemagogus* e às concentrações populacionais humanas. A ocorrência do MAYV no Brasil se destaca principalmente na região Centro-Oeste, com ênfase nos estados do Goiás e Mato Grosso (Celone et al., 2024). A figura 1 mostra a incidência do MAYV na América do Sul, dando ênfase no Brasil.

Figura 1: Incidência do vírus Mayaro no Brasil e na América do Sul.



Figura 1 - Incidência do vírus Mayaro no Brasil e na América do Sul

O mapa representa a América do Sul com ênfase ao Brasil. Os círculos vermelhos apontam todos os locais onde tiveram incidência de casos humanos de Febre Mayaro. É chamada atenção para o estado de São Paulo, pois apesar de não de ter sido encontrado nenhuma pessoa doente, na cidade de São Carlos foi encontrado evidências sorológicas de infecção por Mayaro no sangue de um dos doadores do banco de sangue. Indicando que provavelmente o Mayaro atingiu também o sudeste do Brasil. (Fonte: Adaptado por Romeiro, 2020).

Principalmente disseminado pelo mosquito *Haemagogus janthinomys*, os casos de Febre Mayaro têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Esses surtos afetam tanto humanos quanto animais em regiões tropicais endêmicas da América do Sul, inclusive alcançando grandes áreas urbanas, recentemente chegando até no estado de São Paulo (Romeiro et al., 2020).

Além disso, a identificação do potencial de transmissão do vetor urbano *Aedes aegypti* levou à classificação do vírus como emergente, no qual há a possibilidade de estabelecimento de um ciclo urbano, semelhante ao ocorrido com o vírus Chikungunya (Long et al., 2011; Figueiredo e Figueiredo, 2014). Diferentemente do ciclo silvestre, no qual os primatas não humanos são os principais hospedeiros e ampliadores do vírus, no ciclo urbano os seres humanos são o alvo principal desses vírus, se tornando o hospedeiro de importância epidemiológica, como exemplifica a Figura 2. Dessa forma, caso o *Aedes aegypti* se torne o principal vetor do MAYV, há a possibilidade de estabelecimento de um cenário epidêmico no Brasil, assemelhando-se aos eventos ocorridos nos últimos anos com os vírus Zika e Chikungunya (Long et al., 2011; Esposito et al., 2017; Doderro-Rojas et al., 2020).

Figura 2: Diferença do ciclo urbano e ciclo silvestre das arboviroses e seus vetores.

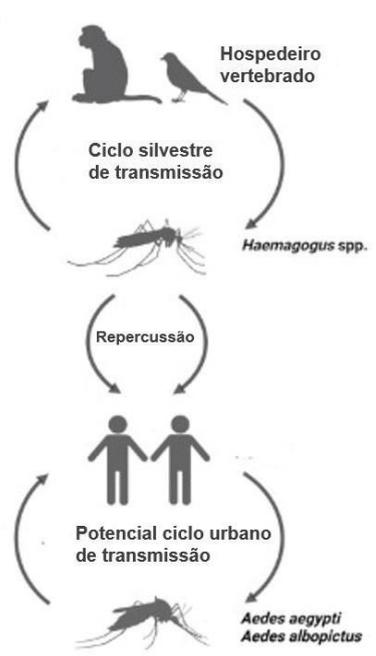


Figura 2 - Diferença do ciclo urbano e ciclo silvestre das arboviroses e seus vetores.

Arboviroses no ciclo silvestre são transmitidas por vetores de caráter silvestres e possuem os primatas não humanos como hospedeiros principais. Já no ciclo urbano, o vírus possui o homem como principal hospedeiro e é disseminado por vetores de hábitos urbanos, como é o caso do *Aedes aegypti*. (Fonte: Adaptado por por Abdullah, 2022)

Sendo assim, com base na literatura é muito provável que devido a dispersão geográfica do MAYV, os humanos contraíam a infecção de forma acidental ao ter contato com ambientes florestais. Portanto, indivíduos que trabalham ou residem nessas áreas estão sob um risco substancialmente maior de infecção em comparação com aqueles que habitam regiões urbanas (Abad-Franch et al., 2012; Mota et al., 2015). Inclusive, o Ministério da Saúde

define a Febre Mayaro como uma doença que se dissemina por um “vírus de área de mata, rural ou silvestre, e que geralmente afeta indivíduos susceptíveis que adentram espaços onde macacos e vetores silvestres habitam” (Ministério da Saúde, 2024). Porém, o MAYV representa uma preocupação crescente para a saúde pública, devido ao processo de urbanização, que se assemelha a trajetória epidemiológica do vírus Chikungunya, um alfavírus intimamente associado ao MAYV (Figueiredo E Figueiredo, 2014).

1.1.2 Patogenia

A patogênese do MAYV é caracterizada por um quadro clínico específico, no qual o paciente apresenta sintomas como febre aguda, exantema maculopapular e principalmente artralgias incapacitantes e duradouras, podendo se estender por meses e até anos. Esses sintomas se assemelham muito ao de outras arboviroses como Zika, Dengue e, sobretudo, ao Chikungunya. O período de incubação oscila entre 7 e 12 dias, e os sintomas geralmente perduram por um período de 2 a 5 dias. A evolução do quadro costuma resultar na recuperação completa, sem deixar sequelas (Torres et al., 2004; Azevedo et al., 2009). Entretanto, quadros mais graves já foram descritos, como poliartrite crônica e, em casos específicos, algumas complicações neurológicas, hemorragia, miocardite e morte (Navarrete-Espinosa; Gómes-Dantés, 2006; Mourão et al., 2012).

A fase aguda da Febre Mayaro é caracterizada após o período de incubação, seguida de uma febre alta com temperaturas variando de 39°C a 40°C, acompanhadas de dores de cabeça, artralgia, mialgia, edemas articulares, calafrios, mal-estar, erupção cutânea, vômitos e diarreia (Izurieta et al., 2011). As artralgias podem se estender por meses afetando principalmente os tecidos dos tornozelos, punhos e dedos do pé, sendo altamente incapacitantes (Azevedo et al., 2009). No estudo realizado por Halsey et al. (2013), foi evidenciado que em certos pacientes as dores articulares se estenderam por pelo menos 1 ano após a fase aguda da doença.

1.1.3 Diagnóstico, Tratamento e Profilaxia

Como dito, a Febre Mayaro é de difícil detecção por ser assemelhar muito a outras arboviroses, como Dengue e Zika e, principalmente, Chikungunya. Porém, a suspeita de infecção pelo vírus se inicia quando há os sintomas característicos juntamente de um histórico de exposição às circunstâncias de risco no período de 15 dias. O diagnóstico é dado através de exames laboratoriais podendo ser direto ou indireto (Ministério da Saúde, 2024).

O diagnóstico direto é realizado por meio de isolamento viral ou biologia molecular. No diagnóstico molecular o RNA viral pode ser identificado em até 5 dias após os sintomas se iniciarem, podendo ser utilizado métodos como PCR convencional ou PCR de transcrição

reversa em tempo real (RT-qPCR). Já o isolamento viral é realizado utilizando culturas celulares, como células Vero (rim de macaco verde Africano) ou C6/36 (*Aedes albopictus*). Apesar de não ser uma metodologia utilizada como um diagnóstico inicial, esse isolamento do vírus pode ser usado para ampliar a quantidade viral, podendo ser um meio que facilite sua detecção posteriormente (OPAS, 2019).

Além desses, há também o diagnóstico indireto, sendo o mais comum deles o sorológico, no qual geralmente são detectados os anticorpos IgM ou IgG contra o MAYV. Podem ser realizados ensaios imunoenzimáticos, inibição da hemaglutinação ou soroneutralização (OPAS, 2019).

Como medida profilática ainda não há vacina licenciada contra o MAYV e o tratamento da doença se baseia apenas no alívio dos sintomas do paciente pois não há uma terapia antiviral específica. Entretanto, em um possível cenário de epidemia da Febre Mayaro, a busca por um tratamento específico, ou seja, um antiviral direcionado a finalizar o ciclo de multiplicação viral no hospedeiro é de suma importância. Contudo, a busca por um antiviral enfrenta desafios significativos, especialmente devido ao fato de a Febre Mayaro ser uma doença negligenciada, com poucos recursos investidos, e os medicamentos antivirais serem altamente específicos para agentes infecciosos individuais (Littler, Oberg, 2005).

1.2 O VÍRUS

1.2.1 Família *Togaviridae*: Gênero *Alphavirus*

Taxonomicamente a espécie *Alphavirus mayaro* pertence ao reino Riboviria, à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. Gênero no qual também se encontram espécies como o *Alphavirus chikungunya* (ICTV, 2024). Os alfavírus englobam espécies de RNA de fita simples com sentido positivo e forma icosaédrica. São pequenos vírus envelopados, os quais são circundados por uma membrana lipoproteica que engloba lipídios e polipeptídeos provenientes da membrana plasmática da célula hospedeira, podendo também abranger glicopeptídeos (Fenner et al, 1974).

Grande parte dos alfavírus são causadores de arboviroses, no qual os invertebrados artrópodes são hospedeiros e vetores do vírus (Chen et al., 2018). Os arbovírus são um grupo de vírus, os quais possuem capacidade de se replicar tanto em hospedeiros invertebrados, como em vertebrados, fazendo com que sua disseminação seja grande (Oliveira et al., 2008). Comumente, os seres humanos atuam como hospedeiros acidentais devido à sua presença em regiões florestais, sendo também muitas vezes classificados como hospedeiros finais. Isso ocorre devido às graves consequências geradas por muitas infecções arbovirais, podendo resultar na fatalidade do indivíduo, interrompendo assim o ciclo (Terzian et al., 2011).

A fita simples de RNA dos alfavírus têm a mesma função que o RNA mensageiro, ou

seja, servem de molde para tradução proteica e as proteínas virais são sintetizadas pelo ribossomo celular (Jose, Snyder, Kuhn, 2009; Figueiredo e Figueiredo, 2014). Os alfavírus possuem entre duas e três glicoproteínas que se agrupam para formar uma única projeção. As extremidades carboxilas dessas glicoproteínas se conectam ao capsídeo, resultando em uma estrutura compactada, que assume a forma do capsídeo (Murray, 2016). As proteínas do capsídeo em todos os alfavírus compartilham uma estrutura semelhante e exibem reatividade cruzada antígenicamente (Murray, 2016).

1.2.2 Genoma e Estrutura do Vírion

O material genético do MAYV é composto por uma fita simples de RNA de sentido positivo, com aproximadamente 11.500 nucleotídeos. Na extremidade 5' é identificado um *capping* com 7-metilguanosina (CAP-5'), enquanto na extremidade 3' há uma cauda poliadenilada (3'-poli-A) (Lavergne et al., 2006). O RNA do MAYV é composto por duas janelas de leitura, conhecidas como *Open Reading Frame* (ORF), sendo separadas por uma região intergênica. A primeira ORF abrange dois terços do RNA genômico, começando pela extremidade 5', e é diretamente traduzida como um RNA mensageiro (mRNA). Essa ORF codifica uma poliproteína de 2436 resíduos de aminoácidos, a qual, após clivagem enzimática, origina quatro proteínas não estruturais (nsP1 – nsP4) essenciais para a replicação e transcrição do RNA viral. Por outro lado, as proteínas estruturais (C, E1, E2, E3, 6k) são derivadas do RNA subgenômico 26S, sendo transcrito desse subgenoma um RNA intermediário de cadeia negativa, idêntico a um terço do RNA genômico, a partir da extremidade 3'. A poliproteína estrutural possui 1252 aminoácidos, conforme documentado por Lavergne et al. (2006) e Napoleão-Pego et al. (2014).

A formação da partícula viral envolve todas as proteínas derivadas do seu genoma, cada uma desempenhando funções específicas em momentos e locais celulares particulares. O nucleocapsídeo icosaédrico do MAYV, com um diâmetro de 65 a 70 nm, é composto por 240 cópias da proteína do capsídeo (C), encarregada de empacotar o RNA viral. Além disso, apresenta uma bicamada lipídica originada da célula hospedeira, na qual as glicoproteínas virais E1 e E2 são integradas (Ooi et al., 2015). A figura 3 mostra a estrutura do MAYV.

Figura 3: Microscopia eletrônica e Estrutura Tridimensional do MAYV.

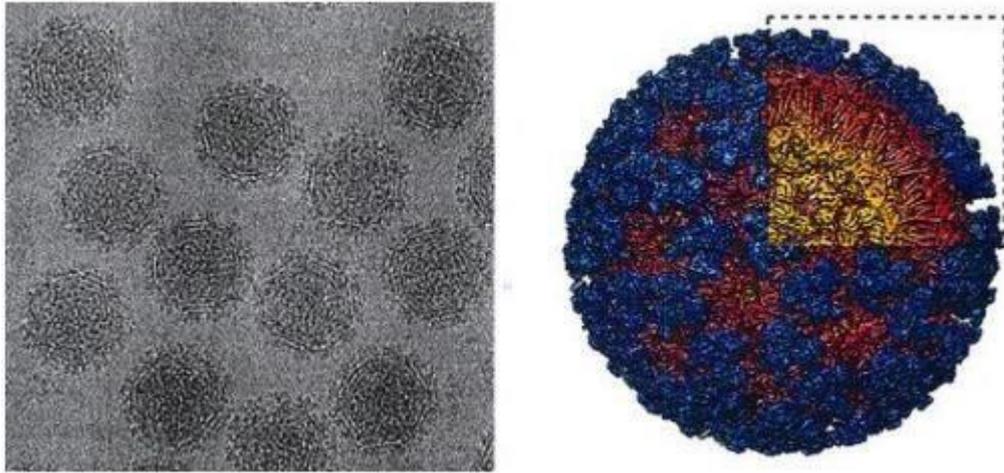


Figura 3 - Microscopia eletrônica e Estrutura Tridimensional do MAYV

É representado do lado esquerdo a microscopia eletrônica do MAYV e do lado direito visão geral da superfície do vírion e sua seção transversal, evidenciando a bicamada lipídica. (Fonte: Hotez e Murray, 2017).

1.2.3 Ciclo de Multiplicação

O processo de multiplicação dos alfavírus tem início com a penetração na célula hospedeira por meio de endocitose, sendo esse processo mediado por clatrina (Carvalho et al., 2017; Marsh E Helenius, 2006). Já dentro dos endossomos, a diminuição do pH, ou seja, o ambiente de caráter ácido, promove a dissociação e liberação do material genético viral (RNA genômico) no citoplasma da célula (Lescar et al., 2001). Em seguida, ocorre a tradução desse RNA genômico e a síntese de proteínas não estruturais. Essas proteínas então formam um complexo de replicação, desempenhando a função de facilitar a síntese do RNA intermediário de sentido negativo. Esse RNA intermediário age como um molde para a produção do RNA subgenômico, do qual serão traduzidas as proteínas estruturais (Schwartz E Albert, 2010; Lulla et al., 2012). Após a clivagem das proteínas estruturais da poliproteína, a síntese de RNA intermediário é inativada e este complexo de replicação age na transcrição de novas cópias de RNA genômico, as quais irão compor as novas partículas virais, sendo empacotado pelas proteínas do capsídeo (C) (Strauss, 1994). Algumas proteínas estruturais são processadas, sendo glicosiladas no retículo endoplasmático e Golgi e, logo após, há o transporte das glicoproteínas do envelope (E1-E2) para a membrana plasmática da célula, as quais irão se ligar ao nucleocapsídeo para facilitar a união do capsídeo com a membrana plasmática da célula hospedeira no momento da aquisição do envelope lipídico (Sanz et al., 2003; Garoff, Sjöberg, Chen, 2004). Por fim, as partículas recém formadas deslocam-se em direção à membrana celular e são liberadas por brotamento, adquirindo o envelope lipídico durante esse processo (Solignat et al., 2009). A Figura 4 representa todo esse processo de multiplicação viral de um alfavírus.

Figura 4: Ciclo de Multiplicação de Alfavírus.

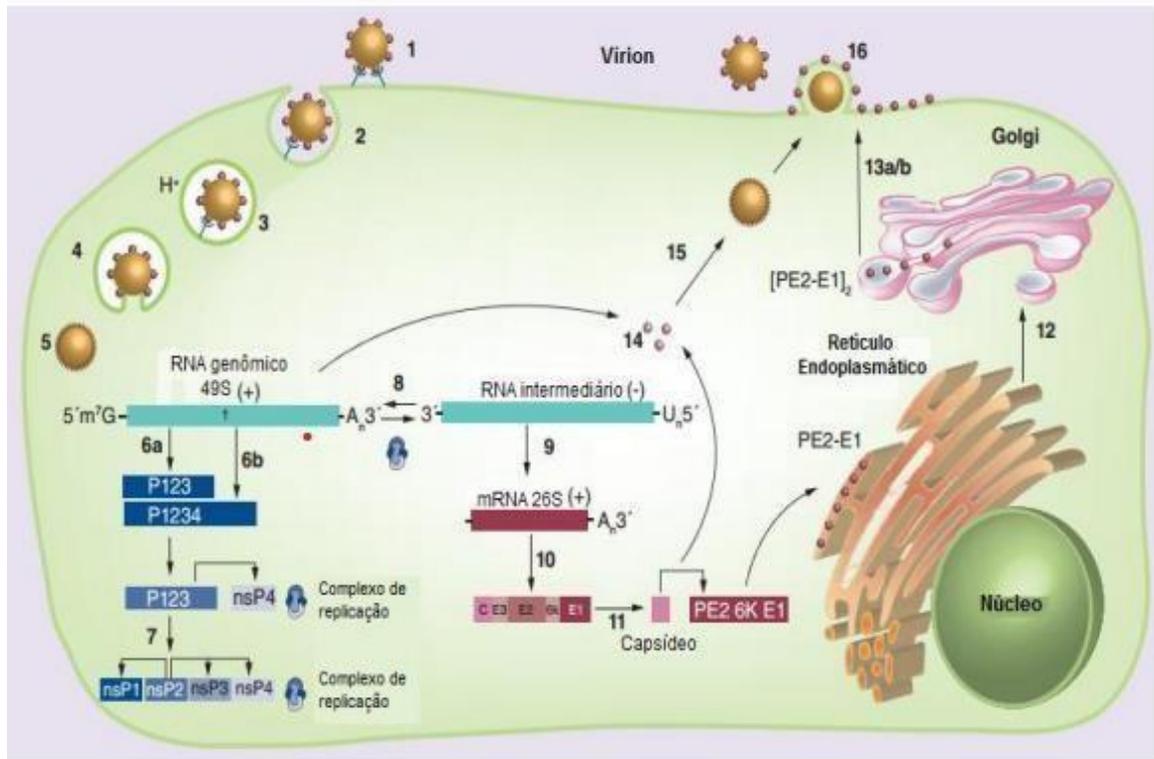


Figura 4 - Ciclo de Multiplicação de um Alfavírus

(1) Ligação do vírion ao receptor celular; (2) Endocitose mediada por receptor; (3) Acidificação do vacúolo; (4) Fusão membranar; (5) Desmontagem do nucleocapsídeo; (6a) Início da tradução; (6b) Continuação da tradução; (7) Processamento; (8) Complexo de replicação atua na transcrição de um RNA intermediário de sentido negativo; (9) Transcrição; (10) Tradução; (11) Processamento; (12) Processamento e maturação de glicoproteínas; (13a) Transporte de glicoproteínas processadas para a membrana plasmática; (13b) Ativação de furina nas espículas do capsídeo viral; (14) Empacotamento do RNA genômico; (15) Montagem do nucleocapsídeo; (16) Liberação de uma nova partícula viral por brotamento. (Fonte: Adaptado de MOTA et al., 2015).

Cada uma dessas etapas descritas são de extrema importância em estudos de pesquisa antiviral, já que podem ser um alvo para o desenvolvimento de um antiviral e assim contribuir para o fim da multiplicação do vírus na célula hospedeira de forma específica.

1.3 PLANTAS COMO FONTE FITOTERÁPICA

A utilização de medicamentos derivados de produtos fitoterápicos, em si, é uma prática com raízes milenares na pesquisa científica. Inúmeras moléculas presentes nesses produtos demonstram a capacidade de proporcionar benefícios à saúde, sendo aplicáveis em diversas doenças (Federico, Dallio, Loguercio, 2017). A codeína, morfina e aspirina são alguns exemplos de medicamentos que atualmente são utilizados e que provêm de moléculas isoladas de fontes naturais (Taranto, 2006; Calland et al., 2012).

Há uma hipótese que sugere que os metabólitos secundários das plantas, em razão de sua síntese voltada para a proteção contra pragas, possam apresentar uma maior propensão

a serem reconhecidos pelos receptores biológicos em comparação com compostos sintetizados de forma aleatória, conforme apontado por Chin et al. (2006). Sendo assim, diversas pesquisas como Braz (2009), Lani et al. (2015), Ferraz et al. (2021) apresentaram extratos provenientes de plantas com ação antiviral em células (*in vitro*) e em animais (*in vivo*), sendo descritos principalmente flavonoides e taninos como componentes do metabolismo secundário de plantas (Cecílio et al., 2012; Lee et al., 2016). Inclusive, a literatura mostra diferentes extratos derivados de plantas que apresentaram atividade contra o MAYV, os quais possuíam flavonoides e taninos (Spindola et al, 2014), como por exemplo a planta *Silybum marianum*, ou cardo de leite.

7.1.1 *Silybum marianum* e silimarina

A Silimarina, um complexo de antioxidantes extraído da planta *Silybum marianum* (Figura 5), destaca-se por possuir ação biológica principalmente contra doenças hepáticas crônicas, cirrose e carcinoma hepatocelular, devido ao seu poder antioxidante, anti-inflamatório e antifibrótico (Federico, Dallio, Loguercio, 2017).

Figura 5: Processo da planta ao extrato de *Silybum marianum*.



Figura 5 - Processo da planta ao extrato de *Silybum marianum*

(A) *Silybum marianum*, popularmente conhecida como cardo de leite mostrando suas folhas com nervuras e aparência leitosa. (B) A flor, caracterizada por espigas duras e flores tubulares. (C) Flor seca e (D) sementes de *S. marianum*. (E) Seu extrato extraído de sementes (flavonolignanas de silimarina). (Fonte: Adaptado de Mohammadinejad et al., 2013).

A prática do cultivo de *Silybum marianum* com propriedades benéficas para a saúde remonta ao período do Antigo Egito. A considerável ênfase dedicada a essa planta pelos egípcios sugere, provavelmente, uma correlação com seu potencial impacto na saúde humana (Federico, Dallio, Loguercio, 2017). O principal composto ativo da Silimarina é chamado de Silibina, e já foi demonstrado na literatura que se destaca por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e hepatoprotetora (Federico, Dallio, Loguercio, 2017).

Entre suas propriedades bioativas, a silimarina demonstrou impactos positivos no tratamento de diversas condições, como câncer, diabetes, hepatites, doença hepática

gordurosa não alcoólica, infecções pelos vírus da hepatite B e C (HBC e HCV), síndrome metabólica, depressão, doenças cardiovasculares e talassemia (Camini E Costa, 2020). Além disso, outro estudo na literatura já demonstrou que a silimarina possui atividade antiviral contra Chikungunya, um alfavírus relacionado ao MAYV (Lani et al., 2015),

Com isso, nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que a Silimarina possui atividade antiviral contra o MAYV, reduzindo a carga viral e que ela consegue restaurar a homeostase redox nas células infectadas, tanto *in vitro* como *in vivo* (camundongos). Dessa forma, este trabalho avaliou de que forma a silimarina atua no ciclo de multiplicação do MAYV para que ocorra a inibição viral observada nos estudos anteriores. Os resultados aqui obtidos irão reforçar o potencial efeito antiviral da silimarina na infecção pelo MAYV e abrem perspectivas do seu uso como abordagem farmacológica.

2. JUSTIFICATIVA

As viroses emergentes e reemergentes chamam a atenção das autoridades sanitárias em todo o mundo, pois surgem como problemas importantes de Saúde Pública, tanto em áreas urbanas quanto em áreas rurais. Alterações no ecossistema e, principalmente, no comportamento humano podem propiciar a disseminação desses vírus que, por sua vez, afetam toda a sociedade. Nesse sentido, as doenças virais transmitidas por vetores artrópodes (arboviroses) estão entre as mais preocupantes, visto que elas apresentam grande capacidade de dispersão. Dentro do cenário brasileiro atual, uma das preocupações dos Virologistas é a emergência de viroses ainda não caracterizadas, para as quais não se conhece a patogenia, tratamento e formas de controle.

Portanto, tendo em vista que a Febre Mayaro é uma arbovirose em potencial disseminação, emergente, no qual um dos quadros clínicos é altamente debilitante e pode persistir por meses e, ainda, que atualmente não há tratamento disponível ou vacina preventiva, então 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. Assim, como já havíamos demonstrado o potencial da silimarina em inibir o MAYV de forma seletiva, tanto em célula como em modelo animal, fez-se necessário iniciar a caracterização dos mecanismos de ação antiviral desse fitoterápico. Dessa forma, os dados desse estudo certamente fornecem maior entendimento da ação da silimarina, abrindo perspectivas em relação a um possível uso farmacológico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos de ação antiviral da silimarina contra o MAYV.

3.2 Objetivos Específicos:

3.2.1 Definir uma concentração de uso da silimarina para os ensaios.

3.2.2 Investigar a existência de atividade virucida da silimarina contra o MAYV.

3.2.3 Avaliar o efeito antiviral da silimarina em diferentes etapas do ciclo de multiplicação do vírus:

- a) Na adsorção/interação da partícula viral;
- b) Na penetração do vírus;
- c) Em períodos precoces e tardios do ciclo de multiplicação do vírus.

4. METODOLOGIA

4.1 Células, vírus e composto

Para obtenção do estoque viral (amostras pool trabalho), o MAYV foi propagado em células de rim de macaco verde africano (Vero) e, posteriormente, titulado pelo método de contagem das unidades formadoras de placas (UFP). Tais células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂, com meio DMEM (Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco, Cultilab, Brasil) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, Brasil), penicilina/estreptomicina (200 U/mL, Sigma-Aldrich, EUA) e anfotericina B (2,5 µg/mL, Sigma-Aldrich, EUA). A amostra de MAYV (Acre27) utilizada neste trabalho foi gentilmente fornecida pelo Professor Dr. Maurício Lacerda Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São Paulo), e foi originalmente isolada de sangue de uma paciente febril e malária negativo de Acrelândia – Bacia Amazônica, Acre, Brasil (cadastro SisGen nºA249753). A silimarina foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich (EUA) e foi diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) puro, em uma concentração de 25 mg/mL. Após a diluição, o estoque foi armazenado até o momento do uso em freezer -20°C.

4.2 Avaliação de Atividade Virucida

Inicialmente foi investigado se a silimarina possui efeito virucida contra o MAYV. Virucida seria aquele composto capaz de inibir/bloquear o vírus antes mesmo do contato com as células, independentemente dos mecanismos de multiplicação viral. Para isso, 100 µL de uma suspensão viral contendo 5×10⁶ UFP/mL de MAYV foi incubada com igual volume de meio DMEM sem SFB e contendo silimarina em uma concentração inibitória, previamente

determinada a partir da avaliação da concentração efetiva protetiva para 90% das células infectadas (CE_{90}), a qual foi igual a 150 $\mu\text{g/mL}$. Em paralelo, a mesma quantidade de vírus foi adicionada em meio sem SFB e sem adição de composto, mantida como controle viral. Após 1 hora de incubação em estufa a 37°C, tanto o controle viral como o vírus tratado foram diluídos de 10^{-1} a 10^{-5} e inoculados em culturas semiconfluentes de células Vero contendo 1×10^6 células/poço, implantadas previamente em uma placa de 6 poços, para titulação viral pelo método de placas de Dulbecco (Dulbecco, 1952). Posteriormente à etapa de adsorção, com agitação a cada 10 minutos por 1 hora, o inóculo foi removido, os poços lavados com PBS 1x e adicionado 3 mL/poço de meio 199 semissólido acrescido de 1,25% CMC e 1,5% SFB, seguido por nova incubação a 37°C em estufa com atmosfera umidificada e 5% de CO_2 . Após 48 horas, o meio será despejado e as células fixadas em solução formol 10% por 30 minutos. Por fim, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta 1% por 15 minutos e os poços lavados com água para remoção do excesso de cristal violeta (Adaptado de Pujol et al., 2012).

4.3 Avaliação de atividade antiviral na Etapa de Adsorção

Neste experimento, a silimarina foi avaliada se seria capaz de impedir a ligação do MAYV às células-alvo, ou seja, se apresenta alguma interação com receptores celulares responsáveis pela entrada do MAYV, o que poderia bloquear a infecção viral nesta etapa. Para a realização do ensaio, uma placa de 12 poços foi confeccionada com a contagem de 5×10^5 células/poço 24 horas antes, para que a monocamada apresentasse 90% de confluência no momento do ensaio. Antes de se iniciar o ensaio, a placa contendo as células foi refrigerada a 4°C por 15 minutos. Então, as células foram infectadas com MAYV (moi 1) na presença de silimarina em uma concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$, enquanto nenhum inibidor foi adicionado às células usadas como controle viral. A placa foi novamente incubada a 4°C por 1 hora. Em seguida, o composto e inóculo foram removidos e as monocamadas celulares lavadas com PBS 1x. Após a lavagem, em cada poço foi adicionado 1 mL de meio DMEM 5% SFB fresco. A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas, quando foi então coletado o sobrenadante dos poços para posterior quantificação viral por titulação pelo método de placas de Dulbecco. A revelação foi feita após 48 horas pela mesma técnica descrita no item 4.2 (Adaptado de Pujol et al., 2012).

4.4 Avaliação de atividade antiviral na etapa de penetração

Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se a silimarina apresentava interação no momento da penetração viral, após a adsorção, ou seja, se seria capaz de bloquear ações enzimáticas de componentes da membrana importantes na entrada do vírus na célula. Da mesma forma que a etapa anterior, para a realização do ensaio, foi confeccionada previamente

uma placa de 12 poços com 5×10^5 células/poço, para que a monocamada apresentasse 90% de confluência no momento do ensaio. Para avaliar a atividade da silimarina nesta etapa, as células Vero foram infectadas com 150 μ L da suspensão de MAYV (moi 1) sem nenhum tratamento prévio e incubadas a 4°C por 1 hora, para que ocorresse somente a adsorção e não a penetração viral, uma vez que esta só ocorre com participação das enzimas ativas a 37°C. Em seguida, o inóculo viral foi removido, as células lavadas com PBS 1x e adicionada silimarina em uma concentração de 150 μ g/mL, sendo as culturas incubadas a 37°C. Apenas os poços correspondentes ao controle celular e viral não tiveram as células tratadas. Após 1 hora, as células foram lavadas com tampão citrato pH 3.0, de modo que inativasse qualquer vírus que tenha apenas adsorvido e não penetrado, garantindo que caso o composto atuasse na penetração viral, não haveria possibilidade de qualquer vírus entrar na célula após a remoção do composto antiviral. Após 3 minutos foi realizado a retirada do tampão, a cultura celular foi lavada com PBS 1x e foi adicionado 1 mL de meio DMEM 5% SFB fresco. A placa foi incubada novamente em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas, quando então foi coletado o sobrenadante de cada poço para posterior quantificação viral por titulação pelo método de placas de Dulbecco. A revelação foi feita após 48 horas pela mesma técnica descrita no item 4.2 (Adaptado de Pujol et al., 2012).

4.5 Avaliação da atividade antiviral em etapas precoces e tardias do ciclo de multiplicação do vírus

Nesta abordagem, a silimarina foi adicionada em diferentes momentos após a infecção viral, em uma concentração de 150 μ g/mL. O objetivo foi avaliar a ação da silimarina em momentos precoces e tardios do ciclo de multiplicação do MAYV. Para isso, 5×10^4 células foram implantadas por poço em uma placa de 96 poços, sendo empregadas 9 condições diferentes, e em triplicatas. As condições avaliadas foram:

- i) células não tratadas e não infectadas (controle celular),
- ii) células não tratadas e infectadas (controle viral),
- iii) células infectadas e tratadas -2, 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas pós-infecção (hpi).

Assim como nos demais ensaios, a infecção foi realizada utilizando-se moi de 1, sem nenhum pré-tratamento. A placa foi incubada em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂ por 48 horas. Em seguida, uma alíquota do sobrenadante em cada condição foi coletada para posterior quantificação da produção viral por titulação pelo método de placas de Dulbecco. A revelação foi feita após 48 horas pela mesma técnica descrita no item 4.2 (Ferraz et al., 2024).

4.6 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 9.0, para a maioria das análises, em que havia somente dois grupos, o teste t-Student ($p \leq 0,05$) foi utilizado. Já para análises com mais grupos foi utilizado o teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey e nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Os resultados apresentados representam a Média \pm SD de cada grupo.

5. RESULTADOS

5.1 Estoque Viral

O MAYV foi multiplicado em células Vero em razão da susceptibilidade e permissividade do vírus nesse tipo celular. Após a titulação, o título viral do estoque que foi utilizado nos experimentos foi de $1,3 \times 10^7$ UFP/mL, bem similar a outros experimentos descritos na literatura (Oliveira, 2008; Ferraz, 2018)

5.2 Determinação da concentração de uso da silimarina

Inicialmente foi realizado um experimento para determinar qual seria a concentração de uso da silimarina nos ensaios de mecanismo de ação, uma vez que em estudos anteriores do grupo, a atividade antiviral global da silimarina havia sido determinada com foco na viabilidade celular, ou seja, na proteção das células em relação a infecção viral. Contudo, a carga viral do MAYV após o tratamento com a silimarina ainda não havia sido avaliada. Dessa forma, o sobrenadante de células infectadas com MAYV e tratadas com silimarina foi quantificado e os resultados são mostrados na Figura 6.

Figura 6: Determinação da concentração de uso da silimarina para os ensaios de mecanismo de ação

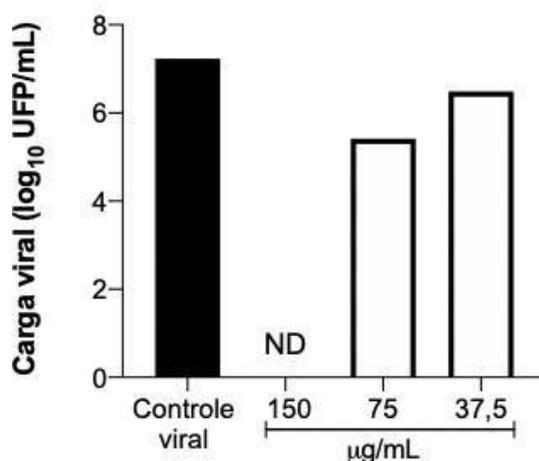


Figura 6 - Determinação da concentração de uso da silimarina para os ensaios de mecanismo de ação

A coluna em preto indica o controle viral, no qual as células foram infectadas por MAYV sem nenhum tratamento. Já as colunas brancas apresentam os resultados em que as células foram infectadas por MAYV e tratadas com silimarina nas concentrações de 75 µg/mL e 37,5 µg/mL. ND: não detectado.

Como pode-se observar, todas as três concentrações de silimarina avaliadas reduziram a carga viral quando comparado ao controle viral (sem tratamento), contudo

somente a concentração de 150 µg/mL foi capaz de reduzir 100% da carga viral do MAYV, uma inibição de 7 unidades logarítmicas. Dessa forma, os ensaios seguintes para caracterização do mecanismo de ação antiviral da silimarina contra o MAYV foram realizados utilizando a concentração de 150 µg/mL.

5.3. Análise da atividade antiviral na Etapa Virucida

A análise dos mecanismos de ação da atividade antiviral do fitoterápico silimarina se iniciou pela avaliação da atividade virucida. Esse experimento avaliou se a silimarina seria capaz de inibir ou bloquear a partícula viral antes mesmo de entrar em contato com as células. O resultado obtido é apresentado na Figura 7.

Figura 7: Silimarina não apresenta atividade Virucida contra o MAYV.

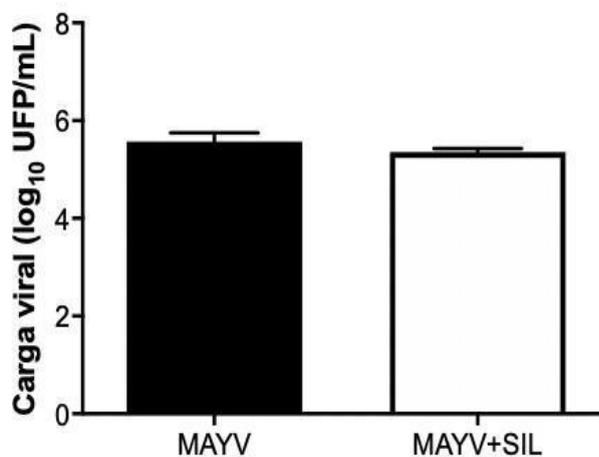


Figura 7 - Silimarina não apresenta atividade Virucida contra o MAYV.

A coluna em preto indica o controle viral, no qual as células foram infectadas por MAYV sem nenhum tratamento. Já a coluna branca apresenta os resultados em que as células foram infectadas por MAYV e tratadas com 150 µg/mL de silimarina. Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes, não apresentando diferença estatística (Teste-t Student, $p < 0,05$).

O resultado mostrou que a silimarina não possui atividade virucida significativa contra o MAYV. Os valores da quantificação viral apresentaram uma variação muito baixa quando comparado ao grupo sem tratamento (MAYV) e com tratamento (MAYV+SIL), enquanto o controle viral apresentou uma média de $3,6 \times 10^5$ UFP/mL, o tratado com silimarina mostrou uma carga viral igual a $2,2 \times 10^5$ UFP/mL, sem diferença estatística. Assim, esses dados sugerem que a atividade antiviral da silimarina se situa em alguma etapa do ciclo de multiplicação viral, e que ela não é capaz de inibir/bloquear a partícula viral do MAYV com eficácia.

5.4. Análise da atividade da etapa de adsorção.

Em seguida, iniciando a avaliação do mecanismo de ação no ciclo viral, foi analisada a etapa de adsorção. A adsorção é a primeira etapa no ciclo de multiplicação viral. Nesse experimento foi observado se a silimarina seria capaz de impedir a ligação do MAYV nas células, impossibilitando a infecção. O resultado obtido é apresentado na Figura 8.

Figura 8: Silimarina não apresenta atividade na etapa de adsorção contra o MAYV.

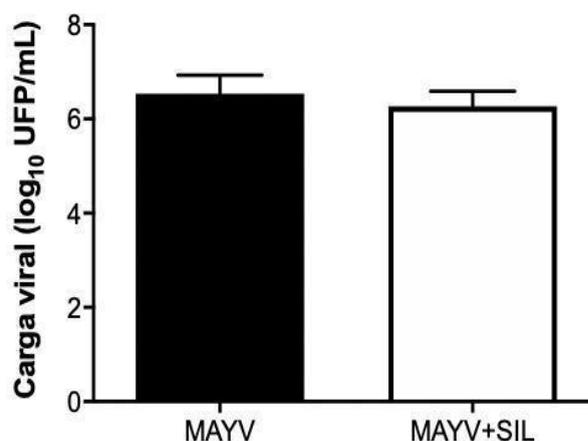


Figura 8 - Silimarina não apresenta atividade na etapa de adsorção contra o MAYV.

A coluna em preto indica o controle viral, no qual as células foram infectadas por MAYV sem nenhum tratamento. Já a coluna branca apresenta os resultados em que as células foram infectadas por MAYV e tratadas com 150 µg/mL de silimarina. Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes, não apresentando diferença estatística (Teste-t Student, $p < 0,05$).

A partir da análise dos resultados é possível perceber que a silimarina também não apresentou atividade antiviral significativa contra o MAYV na adsorção, ou seja, o fitoterápico não foi capaz de impedir a ligação do vírus nos receptores celulares, de forma que resultasse em uma inibição da infecção de forma significativa. Enquanto o controle viral apresentou um valor médio de $4,06 \times 10^6$ UFP/mL, o tratado foi de $2,11 \times 10^6$ UFP/mL.

5.5. Análise da atividade antiviral na etapa de penetração.

Nesta etapa foi avaliado se a silimarina apresentava interação no momento da penetração viral, logo após a adsorção, ou seja, se seria capaz de bloquear ações enzimáticas de componentes da membrana importantes para entrada do vírus na célula. O resultado obtido é apresentado na Figura 9.

Figura 9: Silimarina não apresenta atividade na etapa de penetração contra o MAYV.

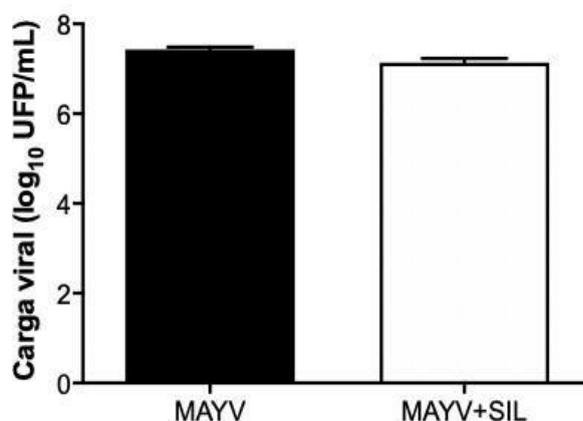


Figura 9 - Silimarina não apresenta atividade na etapa de penetração contra o MAYV.

A coluna em preto indica o controle viral, no qual as células foram infectadas por MAYV sem nenhum tratamento. Já a coluna branca apresenta os resultados em que as células foram infectadas por MAYV e tratadas com 150 µg/mL de silimarina. Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes, não apresentando diferença estatística (Teste-t Student, $p < 0,05$).

Assim como na etapa anterior, o tratamento com a silimarina também não resultou em uma redução significativa em relação ao controle viral. A média da quantificação da carga viral no controle viral foi de $2,7 \times 10^7$ UFP/mL, enquanto a média observada no grupo tratado foi de $1,4 \times 10^7$ UFP/mL, uma redução menor que uma unidade logarítmica.

5.6. Análise de atividade antiviral em etapas precoces e tardias do ciclo de multiplicação do vírus.

No último experimento realizado, a silimarina foi adicionada em diferentes momentos após a infecção viral, sendo também utilizada uma concentração de 150 µg/mL, com o intuito de investigar o impacto do fitoterápico nos estágios iniciais e tardios do ciclo de multiplicação do MAYV. O resultado obtido é apresentado na Figura 10.

Figura 10: Silimarina apresenta atividade antiviral em estágios iniciais e tardios do ciclo de multiplicação do MAYV.

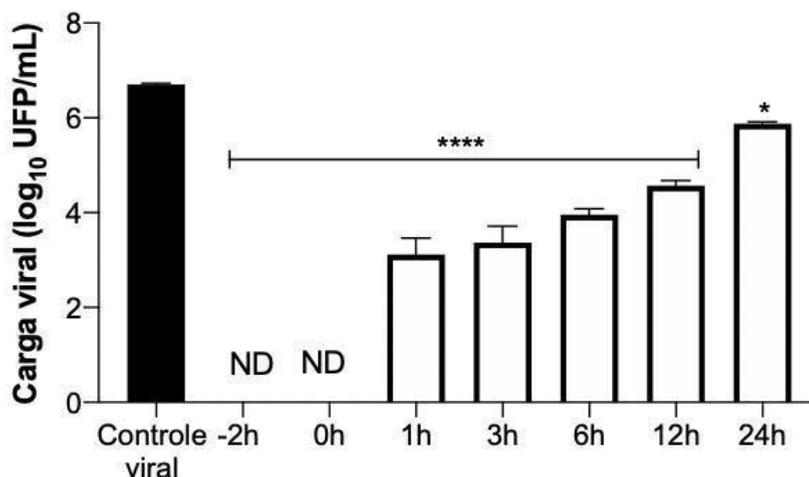


Figura 10 - Silimarina apresenta atividade antiviral contra o MAYV na etapa pós-infecção.

A coluna em preto indica o controle viral, no qual as células foram infectadas por MAYV sem nenhum tratamento. Já as colunas brancas apresentam os resultados em que as células foram infectadas por MAYV e tratadas com 150 µg/mL de Silimarina, em cada tempo pós-infecção. Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes, em que '*' e '****' representam diferença estatística em relação ao controle viral com $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA, $p < 0,05$). ND: não detectado.

Ao analisar os resultados do tratamento após a infecção das células pelo MAYV, pode-se constatar que a silimarina conseguiu reduzir a carga viral de forma significativa em todos os tempos pós-infecção avaliados no estudo. Em -2h (pré-tratamento) e 0h (infecção e tratamento simultâneos), o tratamento com silimarina resultou em uma redução de 100% da carga viral, no qual nenhuma placa de lise viral foi detectada. Esse resultado era esperado e confirmou o observado no ensaio preliminar, em que a concentração de 150 µg/mL foi capaz de reduzir 100% da carga viral quando o tratamento foi realizado concomitante a infecção (figura 6). Em 1 e 3 hpi, apesar da redução não ter sido completa, uma redução significativa foi observada, sendo em torno de 3 logs, obtendo-se 99,99% de redução em ambas as condições. A partir de 6 hpi, o tratamento com a silimarina resultou em uma redução de carga viral um pouco menor, porém ainda assim reduzindo mais de 2 logs, no qual a média do título viral foi de $9,0 \times 10^3$ UFP/mL, uma inibição de 99,82% quando comparado ao controle viral. Quando o tratamento foi iniciado em momentos tardios da infecção, como 12 e 24 hpi, a silimarina continuou reduzindo a carga viral de forma significativa, contudo em uma potência menor. A quantificação viral do tratamento em 12 hpi mostrou uma média de $3,9 \times 10^4$ UFP/mL e, em 24 hpi, de $7,5 \times 10^5$ UFP/mL, que quando comparado ao controle viral ($5,1 \times 10^6$ UFP/mL) reduziu em torno de 99,22% e 85%, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

O fitoterápico silimarina vem sendo muito estudado nos últimos anos e possui ação antioxidante, hepatoprotetora e anti-inflamatória bem descritas na literatura (Federico, Dallio, Loguercio, 2017). Seu potencial antiviral também já foi explorado, sendo relatado ação contra diferentes vírus, como Chikungunya (Lani et al., 2015), Zika (da Silva et al., 2020), Dengue (Low et al., 2021), Enterovirus-71 (Lalani et al., 2020), Influenza A (Song e Choi, 2011) e Hepatite C (Wagoner et al., 2010).

Devido à semelhança entre o CHIKV e MAYV, e com base nos resultados obtidos por Lani e colaboradores (2015), nosso grupo de pesquisa foi instigado a considerar se a silimarina também teria ação contra o MAYV. Com isso, um estudo conduzido pelo nosso grupo em 2018, constatou que o tratamento com a silimarina de células HepG2 infectadas pelo MAYV apresentou atividade antiviral, além de reverter danos oxidativos provocados pelo vírus. Neste estudo, a concentração de silimarina necessária para proteger 50% das células da infecção por MAYV (CE₅₀) foi de 3,58 µg/mL, concentração essa bem abaixo da citotóxica, resultando em um índice de seletividade (IS) de 29,6 (Camini et al., 2018). Como compostos que apresentam IS maiores que 10 são descritos como promissores e seguros para serem testados em modelo animal, com possibilidade de ausência de toxicidade, nosso grupo continuou os estudos com MAYV e silimarina. Demonstramos que atividade antiviral observada *in vitro* se confirmou também *in vivo*, no qual o tratamento com silimarina reduziu significativamente a carga viral em órgãos afetados, como baço, fígado e patas (Ferraz et al., 2021). Dessa forma, os resultados do presente trabalho vem para complementar os dados do grupo sobre ação antiviral da silimarina contra o MAYV.

No trabalho realizado por Lani e colaboradores (2015), a silimarina foi avaliada contra CHIKV, explorando também os mecanismos de ação antiviral. O CHIKV, assim como MAYV, pertence ao gênero *Alphavirus*, apresentando semelhanças significativas entre eles, especialmente em relação ao quadro clínico e ao ciclo de multiplicação (Calisher, 1994; Vieira et al., 2015). Nesse contexto, os autores observaram que a silimarina inibe o CHIKV durante os estágios iniciais do ciclo de multiplicação, imediatamente após a entrada do vírus na célula, de forma análoga ao que foi observado para o MAYV. Contra o CHIKV, a silimarina demonstrou eficácia na inibição do vírus desde o início do tratamento até as primeiras horas pós-infecção (6h), sendo observada uma redução de 100% da carga viral quando o tratamento se iniciou 2 hpi, em uma concentração de 100 µg/mL. Contudo, em 8 hpi, o tratamento com a silimarina não apresentou mais diferença significativa quando comparado ao controle viral, diferentemente do que foi observado para o MAYV, em que mesmo o tratamento iniciando 24 hpi mostrou uma redução significativa da carga viral. Para o MAYV, mesmo não observando uma redução completa nas primeiras horas pós-infecção, a redução da carga viral

no intervalo de 1 a 6 hpi foi superior a 99%. Além disso, da mesma forma que o observado para o MAYV, o estudo de Lani e colaboradores (2015) também não identificou atividade antiviral da silimarina em outras etapas da multiplicação viral, como adsorção, penetração e atividade virucida.

Além da atividade antiviral contra o CHIKV, a silimarina também já demonstrou atividade contra outras arboviroses, como Dengue (Low et al., 2021) e Zika (da Silva et al., 2020). Inclusive, os estudos com o vírus Zika (ZIKV) foram desenvolvidos pelo nosso grupo, no qual a silimarina, ao contrário do que foi observado para o MAYV, demonstrou uma inibição de 93,8% da carga viral na atividade virucida, de 98,4% e 97% nas etapas de adsorção e penetração, respectivamente. Quando o tratamento foi realizado na concentração de 100 µg/mL após a infecção, observou-se uma redução significativa em todos os tempos analisados, sendo que no intervalo de 0 a 6 hpi a redução na carga viral foi de apenas 1 log, em torno de 90% de redução (da Silva et al., 2020). Quando comparado aos resultados encontrados para o MAYV, no intervalo de 0 a 6 hpi a redução foi superior a 99,99%. Ainda, no pré-tratamento com a silimarina (tempo de -2h), para o ZIKV foi observado uma redução de 2 logs, enquanto para o MAYV observamos uma redução completa de carga viral, de 6 logs.

No estudo em que foi avaliada a atividade da silimarina em relação ao vírus da dengue, quando analisado principalmente o sorotipo 3 (DENV-3), a atividade virucida foi o principal mecanismo de ação da silimarina, apresentando um IS de 10,87. A silimarina conseguiu reduzir 95,13% dos focos virais a uma concentração de 200 µg/mL. No entanto, ela não inibiu 100% do vírus em nenhuma concentração testada, assim como mostrado para o ZIKV (Low et al., 2021).

Assim como ZIKV e DENV, o vírus da hepatite C (HCV) também é pertencente à família *Flaviviridae*. E ao ser avaliada a ação da silimarina contra HCV, ela também apresentou inibição no ciclo de multiplicação do vírus, destacando a atividade antiviral na etapa de penetração e durante replicação do RNA (Polyaka et al., 2010, Wagoner et al., 2010). Apesar de não ter sido observada atividade na etapa de penetração contra o MAYV, a replicação do RNA pode ser uma etapa que também esteja sendo afetada pela silimarina durante a infecção pelo MAYV, uma vez que se observou uma redução significativa da carga viral mesmo quando o tratamento foi iniciado 24 hpi.

Em um estudo realizado por Lalani e colaboradores (2020), a silimarina foi testada contra o Enterovirus 71, mais conhecido como vírus da doença mão-pé-boca, uma síndrome que ocasiona febre em crianças. Apesar de não ser um arbovírus e possuir um ciclo de multiplicação diferente do MAYV, o estudo também demonstrou que a silimarina foi eficaz contra este vírus. Porém, diferente do que foi demonstrado para o MAYV, a silimarina mostrou uma significativa atividade virucida e na etapa adsorção, impedindo a ligação do vírus à célula, e não apresentou inibição quando o tratamento foi iniciado na pós-infecção. E já em um estudo contra o vírus influenza A, a silimarina apresentou atividade antiviral inibindo apenas a síntese de RNA viral

(Song,Choi,2011).

Dessa forma, de acordo com a literatura estudada, é possível constatar que a silimarina possui efeito antiviral contra diversas arboviroses e outros vírus, sendo muitas vezes em etapas diferentes da pós-infecção. A descoberta de uma redução nessa etapa do ciclo de multiplicação é de grande relevância para pesquisas futuras, pois indica que provavelmente a silimarina está impedindo a formação de novas partículas de MAYV, agindo no processo de desnudamento, replicação do genoma, morfogênese ou mesmo no brotamento da partícula viral. Porém, ainda serão necessários mais estudos para concluir a caracterização deste mecanismo de ação, incluindo a avaliação da redução do RNA genômico após o tratamento a fim de avaliar se está ocorrendo uma redução da expressão de proteínas virais, bem como a realização de análises por microscopia eletrônica.

7. CONCLUSÃO

Esse trabalho foi importante para uma maior compreensão da atividade antiviral apresentada pela silimarina contra o MAYV, evidenciando a principal etapa do ciclo de multiplicação viral em que esse fitoterápico tem ação. Foi mostrado que a potente atividade anti-MAYV da silimarina se deve a inibição de estágios subsequentes a entrada do vírus na célula, uma vez que os resultados mostraram ausência de atividade virucida, na etapa de adsorção e penetração, mas uma diferença significativa mesmo quando o tratamento com a silimarina foi iniciado 24 hpi. Assim, este trabalho avança no estudo sobre a ação anti-MAYV da silimarina, contribuindo para o desenvolvimento de uma possível abordagem farmacológica contra a Febre Mayaro, que até então não possui um tratamento específico.

REFERÊNCIAS

- Abad-Franch, F., Grimmer, G. H., de Paula, V. S., Figueiredo, L. T. M., Braga, W. S. M., & Luz, S. L. B. (2012). Mayaro Virus Infection in Amazonia: A Multimodel Inference Approach to Risk Factor Assessment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001846>
- Aitken, T. H. G., Downs, W. G., Anderson, C. R., Spence, L., & Casals, J. (1960). Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.131.3405.986>
- Anderson, C. R., Downs, W. G., Wattley, G. H., Ahin, N. W., & Reese, A. A. (1957). Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1012>
- Azevedo, R. S. S., Silva, E. V. P., Carvalho, V. L., Rodrigues, S. G., Nunes Neto, J. P., Monteiro, H. A. O., Peixoto, V. S., Chiang, J. O., Nunes, M. R. T., & Vasconcelos, P. F. C. (2009). Mayaro fever virus, Brazilian amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 15(11). <https://doi.org/10.3201/eid1511.090461>
- Barros, E. R. de, Pires, R. M. T., Amorim, M. T., & Holanda, G. M. (2021). Epidemiologia Do Vírus Mayaro Na América Latina Entre 2009 A 2019. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218*, 2(5). <https://doi.org/10.47820/recima21.v2i5.327>
- Calisher, C. H. (1994). Medically important arboviruses of the United States and Canada. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1128/CMR.7.1.89>
- Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y., & Séron, K. (2012). Hepatitis C virus and natural compounds: A new antiviral approach? In *Viruses* (Vol. 4, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/v4102197>
- Camini, F. C., Silva T. C., Caetano C. C. S., Almeida, L., Ferraz A. C., Vittoreti, V., Silva B. M., Silva S. Q., Magalhães J. C., Magalhães C. L. B. (2018). Antiviral activity of silymarina against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral Research*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.023>
- Camini, F. C., & Costa, D. C. (2020). Silymarin: Not just another antioxidant. In *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* (Vol. 31, Issue 4). <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0206>
- Carvalho, C. A. M., Silva, J. L., Oliveira, A. C., & Gomes, A. M. O. (2017). On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. *PeerJ*, 2017(4). <https://doi.org/10.7717/peerj.3245>
- Causey, O. R., & Maroja, O. M. (1957). 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1017>
- Cecílio, A. B., Faria, D. B. de, Oliveira, P. D. C., Caldas, S., Oliveira, D. A. de, Sobral, M. E. G., Duarte, M. G. R., Moreira, C. P. D. S., Silva, C. G., & Almeida, V. L. de. (2012). Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.031>

- Celone, M., Beeman, S., Han, B. A., Potter, A. M., Pecor, D. B., Okech, B., & Pollett, S. (2024). Understanding transmission risk and predicting environmental suitability for Mayaro Virus in Central and South America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 18(1), e0011859. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011859>
- Chen, R., Mukhopadhyay, S., Merits, A., Bolling, B., Nasar, F., Coffey, L. L., Powers, A., Weaver, S. C., Lefkowitz, E. J., Davison, A. J., Siddell, S. G., Simmonds, P., Sabanad-Zovic, S., Smith, D. B., Orton, R. J., & Knowles, N. J. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*, 99(6), 761–762. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001072>
- da Silva, T. F., Ferraz, A. C., Almeida, L. T., Caetano, C. C. da S., Camini, F. C., Lima, R. L. S., Andrade, A. C. dos S. P., de Oliveira, D. B., Rocha, K. L. S., Silva, B. de M., de Magalhães, J. C., & Magalhães, C. L. de B. (2020). Antiviral effect of silymarin against Zika virus in vitro. *Acta Tropica*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105613>
- Vieira, C. J., da Silva, D. J. F., Barreto, E. S., Siqueira, C. E. H., Colombo, T. E., Ozanic, K., Schmidt, D. J., Drumond, B. P., Mondini, A., Nogueira, M. L., & de Moraes Bronzoni, R. V. (2015). Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. *Acta Tropica*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.020>
- Dodero-Rojas, E., Ferreira, L. G., Leite, V. B. P., Onuchic, J. N., & Contessoto, V. G. (2020). Modeling Chikungunya control strategies and Mayaro potential outbreak in the city of Rio de Janeiro. *PLoS ONE*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222900>
- Esposito, D. L. A., & Fonseca, B. A. L. da. (2017). Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? In *Brazilian Journal of Infectious Diseases* (Vol. 21, Issue 5, pp. 540–544). Elsevier Editora Ltda. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>
- Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020191>
- Fenner, F., Pereira, H. G., Porterfield, J. S., Joklik, W. K., & Downie, A. W. (1974). Family and generic names for viruses approved by the international committee on taxonomy of viruses, June 1974. *Intervirology*, 3(3). <https://doi.org/10.1159/000149755>
- Ferraz, A. C., Almeida, L. T., da Silva Caetano, C. C., da Silva Menegatto, M. B., Souza Lima, R. L., de Senna, J. P. N., de Oliveira Cardoso, J. M., Perucci, L. O., Talvani, A., Geraldo de Lima, W., de Mello Silva, B., Barbosa Reis, A., de Magalhães, J. C., & Lopes de Brito Magalhães, C. (2021). Hepatoprotective, antioxidant, anti-inflammatory, and antiviral activities of silymarin against mayaro virus infection. *Antiviral Research*, 194. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105168>
- Ferraz, A. C., Gomes, P. W. P., Menegatto, M. B. da S., Lima, R. L. S., Guimarães, P. H., Reis, J. D. E., Carvalho, A. R. V., Pamplona, S. das G. S. R., Muribeca, A. de J. B., de Magalhães, J. C., Yoshioka e Silva, C. Y., da Silva, M. N., & Magalhães, C. L. de B. (2024). Exploring the antiviral potential of justicidin B and four glycosylated lignans from *Phyllanthus brasiliensis* against Zika virus: A promising pharmacological approach. *Phytomedicine*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155197>

- Figueiredo, M. L. G., & Figueiredo, L. T. M. (2014). Emerging alphaviruses in the americas: Chikungunya and mayaro. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(6). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0246-2014>
- Garoff, H., Sjöberg, M., & Cheng, R. H. (2004). Budding of alphaviruses. *Virus Research*, 106(2 SPEC.ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.08.008>
- Halsey, E. S., Siles, C., Guevara, C., Vilcarromero, S., Jhonston, E. J., Ramal, C., Aguilar, P. v., & Ampuero, J. S. (2013). Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. *Emerging Infectious Diseases*, 19(11). <https://doi.org/10.3201/eid1911.130777>
- Izurieta, R. O., MacAluso, M., Watts, D. M., Tesh, R. B., Guerra, B., Cruz, L. M., Galwankar, S., & Vermund, S. H. (2011). Hunting in the rainforest and mayaro virus infection: An emerging alphavirus in Ecuador. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(4). <https://doi.org/10.4103/0974-777X.91049>
- Jose, J., Snyder, J. E., & Kuhn, R. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. In *Future Microbiology* (Vol. 4, Issue 7). <https://doi.org/10.2217/fmb.09.59>
- Lani, R., Hassandarvish, P., Chiam, C. W., Moghaddam, E., Chu, J. J. H., Rausalu, K., Merits, A., Higgs, S., Vanlandingham, D., Abu Bakar, S., & Zandi, K. (2015). Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep11421>
- Lalani, S. S., Anasir, M. I., & Poh, C. L. (2020). Antiviral activity of silymarin in comparison with baicalein against EV-A71. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2880-2>
- Lavergne, A., Thoisy, B. de, Lacoste, V., Pascalis, H., Pouliquen, J. F., Mercier, V., Tolou, H., Dussart, P., Morvan, J., Talarmin, A., & Kazanji, M. (2006). Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Research*, 117(2). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.006>
- Lee, J. H., Oh, M., Seok, J. H., Kim, S., Lee, D. B., Bae, G., Bae, H. I., Bae, S. Y., Hong, Y. M., Kwon, S. O., Lee, D. H., Song, C. S., Mun, J. Y., Chung, M. S., & Kim, K. H. (2016). Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed and its gallic acid against influenza virus infection. *Viruses*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/v8060157>
- Lescar, J., Roussel, A., Wien, M. W., Navaza, J., Fuller, S. D., Wengler, G., Wengler, G., & Rey, F. A. (2001). The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: An icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*, 105(1). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00303-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00303-8)
- Littler, E., & Oberg, B. (2005). Achievements and challenges in antiviral drug discovery. In *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* (Vol. 16, Issue 3). <https://doi.org/10.1177/095632020501600302>
- Long, K. C., Ziegler, S. A., Thangamani, S., Hausser, N. L., Kochel, T. J., Higgs, S., & Tesh, R. B. (2011). Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(4). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0359>
- Lorenz, C., Freitas Ribeiro, A., & Chiaravalloti-Neto, F. (2019). Mayaro virus distribution in South America. *Acta Tropica*, 198. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105093>

Low, Z. X., OuYong, B. M., Hassandarvish, P., Poh, C. L., & Ramanathan, B. (2021). Antiviral activity of silymarin and baicalein against dengue virus. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98949-y>

Lulla, A., Lulla, V., & Merits, A. (2012). Macromolecular Assembly-Driven Processing of the 2/3 Cleavage Site in the Alphavirus Replicase Polyprotein. *Journal of Virology*, 86(1). <https://doi.org/10.1128/jvi.05195-11>

Marsh, M., & Helenius, A. (2006). Virus entry: Open sesame. In *Cell* (Vol. 124, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.007>

Mota, M. T., Ribeiro, M. R., Vedovello, D., & Nogueira, M. L. (2015). Mayaro virus: A neglected arbovirus of the Americas. In *Future Virology* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1109–1122). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.76>

Mourão, M. P. G., Bastos, M. D. S., de Figueiredo, R. P., Gimaque, J. B. L., dos Santos Galusso, E., Kramer, V. M., de Oliveira, C. M. C., Naveca, F. G., & Figueiredo, L. T. M. (2012). Mayaro fever in the city of manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1). <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0669>

Murray, P., Michal Pfaller, K. R. (2016). Medical Microbiology Murray. In *8th Edition* (Issue Chapter 18) p.502-513, 2020.

Napoleão-Pego, P., Gomes, L.P., Provance-Jr, W., De-Simone, S. (2014). Mayaro Virus Disease. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, 1(3). <https://doi.org/10.15406/jhvr.2014.01.00018>

Navarrete-Espinosa, J., & Gómez-Dantés, H. (2006). Arbovirus causing hemorrhagic fever at IMSS. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 44(4).

Oliveira de Paula, S., Murilo Zerbini Jr Murilo Geraldo de Carvalho, F., & Gomes Oliveira Jose Mario da Silveira Mezencio, M. Marcelo santos de oliveira enagis-may: uma proposta de ensaio de aglutinação indireta para detectar no sangue imunoglobulinas contra o vírus mayaro Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa (2008)

Ooi, Y. S., Dubé, M., & Kielian, M. (2015). BST2/Tetherin inhibition of alphavirus exit. *Viruses*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/v7042147>

Polyak, S. J., Morishima, C., Lohmann, V., Pal, S., Lee, D. Y. W., Liu, Y., Graf, T. N., & Oberlies, N. H. (2010). Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), 5995–5999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914009107>

Pujol, C. A., et al. Antiviral activity against Dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *Int J Biol Macromol*, v.51, n.4, p. 412-416, 2012.

Romeiro, M. F., Fumagalli, M. J., dos Anjos Souza, A. B., & Figueiredo, L. T. M. (2020). Serological evidence of Mayaro virus infection in blood donors from São Carlos, São Paulo, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 114(9). <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa016>

Sanz, M. A., Madan, V., Carrasco, L., & Nieva, J. L. (2003). Interfacial Domains in Sindbis Virus 6K Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3). <https://doi.org/10.1074/jbc.m20661200>

- Schwartz, O., & Albert, M. L. (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>
- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. In *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* (Vol. 58, Issue 3).
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., & Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. In *Virology* (Vol. 393, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.024>
- Song, J. H., & Choi, H. J. (2011). Silymarin efficacy against influenza A virus replication. *Phytomedicine*, 18(10), 832–835. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.026>
- Spindola, K. C. W., Simas, N. K., Salles, T. S., de Meneses, M. D. F., Sato, A., Ferreira, D., Romão, W., & Kuster, R. M. (2014). Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts (Fabaceae, Leguminosae). *Parasites and Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0537-z>
- Srihongse, S., Stacy, H. G., & Gauld, J. R. (1973). A survey to assess potential human disease hazards along proposed sea level canal routes in Panama and Colombia. IV. Arbovirus surveillance in man. *Military Medicine*, 138(7). <https://doi.org/10.1093/milmed/138.7.422>
- Taranto, A.G, Carneiro, J.W.M.; Araújo, M.T.; Silva, B.M. Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos-parte i (Vol. 34).
- Terzian, A. C. B., Mondini, A., de Moraes Bronzoni, R. V., Drumond, B. P., Ferro, B. P., Cabrera, E. M. S., Figueiredo, L. T. M., Chiaravalloti-Neto, F., & Nogueira, M. L. (2011). Detection of Saint Louis Encephalitis virus in Dengue-suspected cases during a Dengue 3 outbreak. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(3). <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0200>
- Torres, J. R., Russell, K. L., Vasquez, C., Barrera, R., Tesh, R. B., Salas, R., & Watts, D. M. (2004). Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. *Emerging Infectious Diseases*, 10(7). <https://doi.org/10.3201/eid1007.030860>
- Wagoner, J., Negash, A., Kane, O. J., Martinez, L. E., Nahmias, Y., Bourne, N., Owen, D. M., Grove, J., Brimacombe, C., McKeating, J. A., Pécheur, E. I., Graf, T. N., Oberlies, N. H., Lohmann, V., Cao, F., Tavis, J. E., & Polyak, S. J. (2010). Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology*, 51(6), 1912–1921. <https://doi.org/10.1002/hep.23587>
- Weise, W. J., Hermance, M. E., Forrester, N., Adams, A. P., Langsjoen, R., Gorchakov, R., Wang, E., Alcorn, M. D. H., Tsetsarkin, K., & Weaver, S. C. (2014). A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002969>
- Zuchi, N., da Silva Heinen, L. B., dos Santos, M. A. M., Pereira, F. C., & Shlessarenko, R. D. (2014). Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(6). <https://doi.org/10.1590/0074-0276140108>