



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA



IGOR DE ANDRADE SANTOS

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS NATURAIS BRASILEIROS E
HIDROXICHALCONAS E CURCUMINOIDES SINTÉTICOS**

UBERLÂNDIA

2018

IGOR DE ANDRADE SANTOS

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS NATURAIS BRASILEIROS E
HIDROXICALCONAS E CURCUMINOIDES SINTÉTICOS**

Pesquisa monográfica apresentada como trabalho de conclusão de curso, requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, na Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Gomes Jardim

UBERLÂNDIA

2018

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS NATURAIS BRASILEIROS E
HIDROXICHALCONAS E CURCUMINOIDES SINTÉTICOS**

Pesquisa monográfica apresentada
como trabalho de conclusão de curso,
requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina, na
Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 12 de dezembro de 2018.

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Gomes Jardim

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”
Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sempre me guiado, me iluminado e cuidado de mim, sem Ele não teria chegado aqui.

Agradeço aos meus pais Eva e Márcio e minha irmã Duda pelo amor incondicional, pela força e pelo carinho mesmo em momentos que não mereci, e que me ajudaram a conquistar meu sonho.

Ao meu namorado, agradeço por me fazer rir e me acalmar quando mais precisei, acrescentando leveza em meus dias.

Aos meus amigos do grupinho fechado, que desde o primeiro dia na faculdade alegraram meus dias e me ajudaram a crescer.

Agradeço à minha orientadora Carol por todos os ensinamentos, por ter confiado em mim, me estimulado a crescer e me tornar um discente melhor do que quando entrei.

Agradeço à minha co-orientadora Jacqueline por toda a calma, todas as conversas, todos os puxões de orelha e, muito mais que isso, obrigado por estar disposta a me ajudar.

Aos meus colegas de laboratório, em especial a Amandinha, pela troca de experiências, pelas brincadeiras, pela ajuda que fizeram com que minha experiência no laboratório fosse maravilhosa. Com certeza não seria a mesma coisa sem vocês.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Organização estrutural do vírus HPV.	13
Figura 2: Ilustração do ciclo replicativo do HPV em células do epitélio escamoso	15
Figura 3: Prevalência de casos de Papiloma vírus Humano (HPV) por capital no Brasil.	16
Figura 4: Estrutura química básica de um flavonoide.	17
Figura 5: Ensaio de viabilidade celular com compostos nas concentrações de 50 μ M e 10 μ M.	24
Figura 6: Células 293T transfectadas com os plasmídeos observadas em microscópio de imunofluorescência.	26
Figura 7: Quantidade de focos nos ensaios de infecção com pseudovírus e viabilidade celular após o tratamento.	27
Figura 8: Comparação das células nos ensaios de infecção com controle não infectado e controle infectado.	28
Figura 9: Viabilidade celular na presença dos pseudovírus e na ausência dos pseudovírus.	29
Figura 10: Organização estrutural do vírus CHIKV.	35
Figura 11: Exemplificação do genoma do vírus Chikungunya.	35
Figura 12: Esquema representativo da replicação do vírus Chikungunya.	37
Figura 13: Mapa apresentando os países que registraram casos de Chikungunya de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC).	39
Figura 14: Desenho esquemático do replicon subgenômico CHIKV-NCT.	43
Figura 15: Viabilidade celular das proteínas isoladas de veneno de serpente em BHK-21.	46
Figura 16: Viabilidade celular das proteínas isoladas de veneno de serpente em BHK-21 CHIKV-NCT.	47
Figura 17: Infectividade do CHIKV em células BHK-21 e, a viabilidade celular do tratamento com cada proteína na sua maior concentração viável.	49
Figura 18: Infectividade do CHIKV em células BHK-21 e, a viabilidade celular em relação à proteína PLA.	50
Figura 19: Taxa de replicação do CHIKV em células BHK-CHIKV-NCT e a viabilidade celular do tratamento com cada proteína na sua maior concentração viável.	51

Tabela 1: Viabilidade celular dos compostos selecionados para ensaio de infecção e as concentrações determinadas como não-citotóxicas.	25
Tabela 2: Viabilidade celular dos compostos selecionados para ensaio de infecção e as concentrações determinadas como não-citotóxicas	48

SUMÁRIO

Capítulo 1: Efeitos de hidroxichalconas e curcuminoides sintéticos na infecção pelo papiloma vírus humano

Resumo	11
Abstract	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Vírus e Patologia	13
1.2 Epidemiologia	15
1.3 Profilaxia e tratamento	16
1.4 Compostos naturais e sintéticos	17
1.4.1 Compostos sintéticos: Hidroxichalconas e Curcuminoides	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos gerais	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. METODOLOGIA	20
3.1 Compostos	20
3.2 Cultura de células 293T	20
3.3 Produção de pseudovírus	20
3.4 Ensaio de viabilidade celular	21
3.5 Ensaio de infecção por pseudovírus	21
3.6 Análise estatística	21
4. RESULTADOS	23
4.1 Viabilidade celular	23
4.2 Produção de pseudovírus	25
4.3 Ensaio antiviral	26
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	31

Capítulo 2: Atividade antiviral de proteínas isoladas de veneno de serpentes brasileiras no ciclo replicativo do vírus Chikungunya

Resumo	33
Abstract	34

1. INTRODUÇÃO	35
1.1 Vírus Chikungunya	35
1.2 Febre Chikungunya	35
1.3 Epidemiologia	38
1.4 Tratamento e profilaxia	39
1.5 Compostos naturais	40
1.5.1 Toxinas de animais	40
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivos.....	41
2.2 Objetivos.....	41
3. METODOLOGIA	42
3.1 Compostos	42
3.2 Linhagem celular BHK-21	42
3.3 Replicon subgenômico	42
3.4 Vírus completo	43
3.5 Ensaio de viabilidade celular em células BHK-21	43
3.6 Ensaio de infectividade viral	44
3.7 Ensaio antiviral em células BHK-21 CHIKV-NCT	44
3.8 Análise estatística	44
4. RESULTADOS	46
4.1 Viabilidade celular	46
4.2 Ensaio antivirais	48
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO 1

EFEITOS DE HIDROXICALCONAS E CURCUMINOIDES SINTÉTICOS NA INFECCÃO PELO PAPILOMA VÍRUS HUMANO

RESUMO

O papiloma vírus humano (HPV) é responsável por uma doença sexualmente transmissível de alta prevalência no mundo todo. O HPV está diretamente relacionado a diversos tipos de cânceres, como por exemplo o de colo de útero. Apesar de existirem abordagens para o tratamento das lesões associadas ao HPV e vacinas profiláticas a fim de prevenir a infecção pelo vírus, não há relatos de tratamento contra a infecção. Compostos sintéticos provenientes de substâncias naturais são uma fonte interessante para o desenvolvimento de novos tratamentos antivirais. Neste contexto, moléculas derivadas das classes das hidroxichalconas e curcuminoides têm atraído interesse devido aos diversos efeitos contra infecções bacterianas, fúngicas e virais. Tais efeitos, somados à capacidade de produção em larga escala dos compostos sintéticos, apresentam uma relação de custo-benefício promissora para o desenvolvimento de novos antivirais. Desta maneira, o presente trabalho buscou avaliar a atividade de hidroxichalconas e curcuminoides sintéticos na infecção do HPV *in vitro*. Para avaliar o efeito desses compostos na infecção do vírus, foram produzidos pseudovírus de HPV utilizando células 293T transfectadas com os plasmídeos p16SHELL e pCIneoEGFP, que expressam as proteínas L1 e L2 do capsídeo e proteína verde fluorescente (EGFP), respectivamente. Posteriormente, células 293T foram infectadas com os pseudovírus produzidos na presença ou ausência dos compostos, em concentrações não tóxicas, para avaliar o efeito do tratamento na infecção. Os resultados demonstraram que os pseudovírus foram capazes de infectar células 293T e expressar fluorescência, entretanto, os compostos avaliados nesse trabalho não apresentaram efeitos estatisticamente significantes na inibição da infecção por HPV.

ABSTRACT

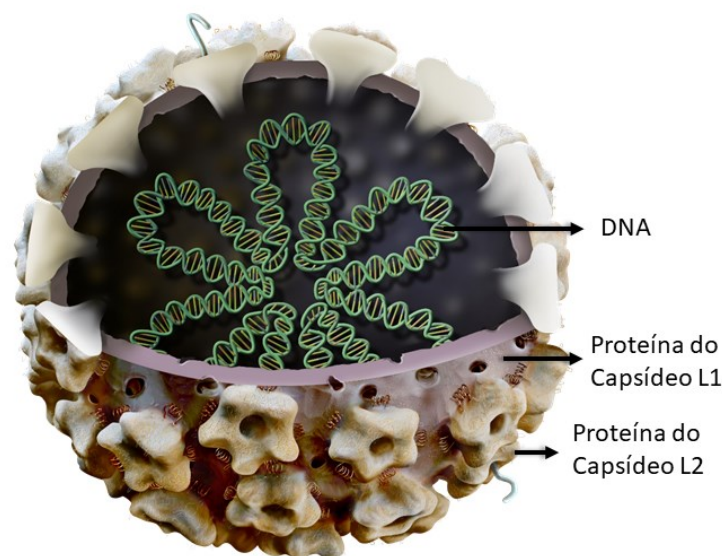
The human papilloma virus (HPV) is responsible for a sexually transmitted disease of high prevalence worldwide. HPV is directly related to several types of cancer, such as cervical cancer. Although there are approaches to the treatment of HPV-associated lesions and prophylactic vaccines to prevent virus infection, there are no reports of treatment against the infection. Synthetic compounds derived from natural substances are an interesting source for the development of new antiviral treatments. In this context, molecules derived from the classes of the hydroxychalcones and curcuminoids have attracted interest due to the diverse effects against bacterial, fungal and viral infections. These effects added to the large-scale production capacity of the synthetic components, have a promising cost-benefit relation for the development of new antivirals. Thus, the present work aimed to evaluate the activity of synthetic hydroxychalcones and curcuminoids in HPV infection *in vitro*. To evaluate the effect of these compounds on virus infection, HPV pseudoviruses were produced using 293T cells transfected with plasmids p16SHELL and pCIneoEGFP, which express the capsid L1 and L2 proteins and green fluorescent protein (EGFP), respectively. Subsequently, 293T cells were infected with the pseudoviruses produced in the presence or absence of the compounds, in non-toxic concentrations, to evaluate the effect of the treatment on infection. The results demonstrated that pseudoviruses were able to infect 293T cells and express fluorescence, however, the compounds evaluated in this work did not show statistically significant effects on inhibition of HPV infection.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus e Patologia

O Papiloma vírus humano (HPV) é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae* do gênero *Papillomavirus*, caracterizado por possuir uma cadeia dupla de DNA (Figura 1), com tamanho aproximadamente de 8 kb (BUCK et al., 2005; MCMURRAY; NGUYEN; WESTBROOK, 2001). Apesar de seu pequeno tamanho, sua biologia é muito complexa. Contém três oncogenes (E5, E6 e E7) os quais regulam o processo de transformação e, duas proteínas regulatórias (E1 e E2) as quais regulam a transcrição e replicação, além de duas proteínas estruturais do capsídeo L1 e L2 (DE VILLIERS et al., 2004). O HPV é espécie-específico, ou seja, o vírus humano só é capaz de infectar humanos (STANLEY, 2010) e apresenta tropismo seletivo para células do epitélio escamoso do trato genital (MOODY; LAIMINS, 2010).

Figura 1: Organização estrutural do vírus HPV. Adaptado de (UNIVERSITY OF NEBRASKA-LINCOLN, 2013)

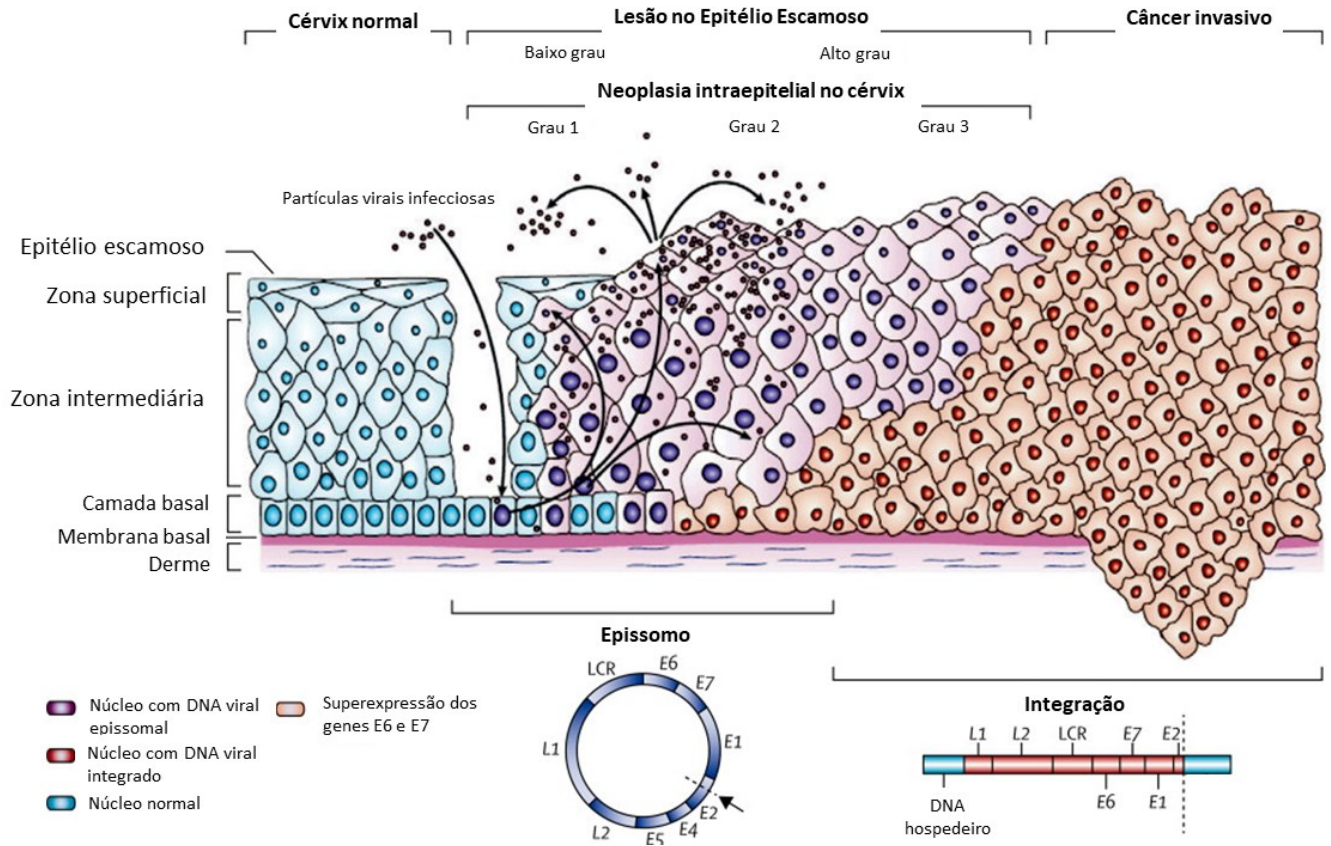


O HPV é classificado em genótipos, o que permitiu a identificação de cerca de 130 tipos do vírus pelo sequenciamento genético, sendo que destes, aproximadamente 40 estão associados à infecção da mucosa genital (STANLEY, 2010). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (*International Agency for Research on Cancer*), quinze tipos de HPV são capazes de causar câncer, classificados como HPVs de alto risco. Os tipos oncogênicos 16 e 18 são os mais comuns, contudo ainda se destacam

os tipos 6, 11, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, e 59 (DE MARTEL et al., 2017; FIGUEIRÊDO, 2013). Nos casos de câncer de colo de útero relacionados à presença do HPV, a principal forma de transmissão é pelo contato sexual (JOHANSSON; SCHWARTZ, 2013). Entretanto, existem outras vias de transmissão, como casos de transmissão vertical e fômites, os quais podem levar a outros tipos de câncer, como os de cabeça e pescoço (CARTER; DING; ROSE, 2011). O grande problema da infecção por HPV são os casos assintomáticos presentes em um número expressivo de indivíduos, sendo que na maioria das vezes são diagnosticados em estágios avançados (BRAATEN; LAUFER, 2008).

O ciclo replicativo do HPV se inicia pela interação do vírus com proteoglicanos de sulfato de heparina presente nas células escamosas, permitindo uma alteração na estrutura do capsídeo, e proporcionando a internalização por endocitose. Dá-se início então ao processo de maturação e acidificação do endossomo para desagregar o capsídeo e expor parcialmente as proteínas L2, responsáveis por recrutar complexos de proteínas celulares. Além disso, L2 se dissocia da proteína L1 e forma o complexo L2/DNA, o qual se dirige ao complexo de golgi, onde permanecerá até o início da mitose e a quebra do envelope nuclear da célula para que consiga adentrar ao núcleo. No núcleo, o DNA viral é mantido como material genético livre ou episossomo extracromossômico. Nesse período, a expressão de genes oncogênicos (genes precoces) é controlada pela amplificação substancial do DNA viral. Ao entrar em mitose novamente, a célula infectada produz uma célula diferenciada que se move para a camada superior do epitélio, onde o vírus se replicará. Nesse estágio, há a produção de grandes quantidades de DNA viral e também das proteínas E6 e E7 que provocam proliferação celular acelerada, prolongamento do ciclo celular e prevenção da apoptose. As proteínas L1 e L2 são produzidas somente em células mais superiores do epitélio, onde ocorrerá a montagem do vírus, para a formação de novas partículas virais que serão liberadas na superfície do epitélio. O processo de replicação do HPV demora de 2 a 3 semanas, por estar associado à migração das células epiteliais da membrana basal até a camada superficial. A liberação de novas partículas no epitélio propicia a infecção de outras células, e associado a isso, células já infectadas passam a produzir clones neoplásicos que podem evoluir a um câncer invasivo, e a integração do DNA viral ao DNA do hospedeiro (Figura 2) (BRONIARCZYK et al., 2018; CROSBIE et al., 2013; SPRIGGS; LAIMINS, 2017; STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999).

Figura 2: Ilustração do ciclo replicativo do HPV em células do epitélio escamoso. Adaptado de (CROSBIE et al., 2013).

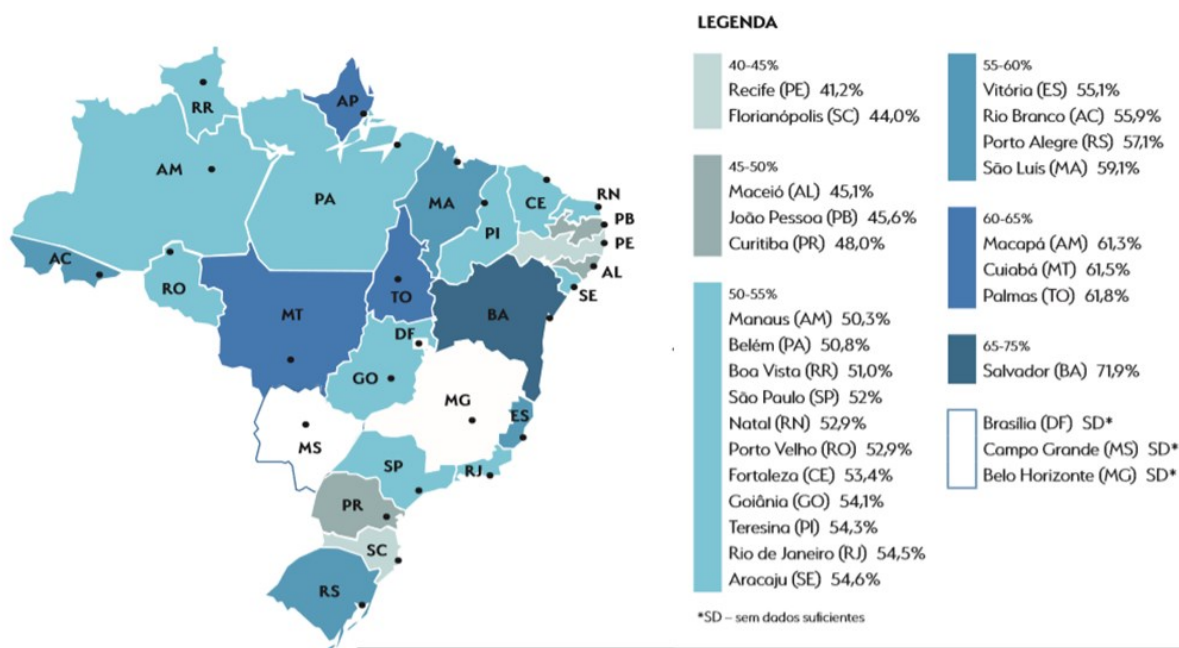


1.2 Epidemiologia

O HPV é prevalente em cerca de 10% da população mundial (CROW, 2012) e está relacionado diretamente com o câncer de colo de útero (FIGUEIRÊDO, 2013). Segundo os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*), em 2012 surgiram aproximadamente 445.000 novos casos de câncer cervical e, neste mesmo ano cerca de 270.000 mulheres morreram do mesmo tipo de câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

No Brasil, um estudo realizado pelo Ministério da Saúde, demonstrou que a prevalência estimada de pessoas infectadas com o HPV é de 54,6%, sendo que desses 38,4% são de genótipos de alto risco. Quando feita a análise da prevalência por estados, foi demonstrado que a região nordeste e centro-oeste foram as regiões mais afetadas pelo vírus, com a prevalência atingindo até 71,9% da população (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 3: Prevalência de casos de Papilomavírus Humano (HPV) por capital no Brasil. Adaptado de - ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR MOINHOS DE VENTO, 2017.



1.3 Profilaxia e tratamento

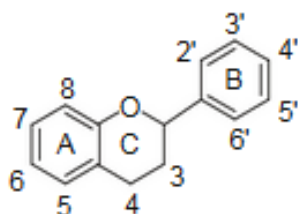
Os tratamentos atualmente utilizados contra o HPV incluem o uso de imunomoduladores para potencializar a resposta imune e, a remoção das verrugas, quando presentes, não havendo terapêutica eficaz para eliminar o vírus após infecção (FIGUEIRÊDO, 2013).

Recentemente, foram desenvolvidas duas vacinas contra o HPV, a Gardasil® (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ), tetravalente contra os tipos 6, 11, 16 e 18 e, a Cervarix™ (GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA), bivalente contra os tipos 16 e 18. Ambas as vacinas são profiláticas (BRAATEN; LAUFER, 2008) contra os tipos mais comuns, produzidas à partir de *virus-like particles* (VLP) para produzir uma resposta humoral (ZARDO et al., 2014). Entretanto, as vacinas são destinadas para apenas alguns tipos deste vírus e para uma faixa etária específica de mulheres, além ainda de poderem causar efeitos colaterais não graves (febre e desmaios) e o preço ser muitas vezes inacessível (FIGUEIRÊDO, 2013).

1.4 Compostos naturais e sintéticos

Desde o início das sociedades, há relatos da utilização de diversas plantas com propriedades medicinais, sendo descritas na medicina tradicional em diversos locais do mundo (CRAGG; NEWMAN, 2014). A procura de substâncias naturais têm sido uma importante via para a produção de fármacos (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014). Dentre as diversas classes de compostos naturais, os flavonoides tem despertado bastante interesse nos últimos anos (MACHADO et al., 2008). São encontrados em muitos vegetais em diferentes concentrações e, substâncias derivadas dessa família tem atraído interesse devido ao seu efeito contra infecções virais (LALL; HUSSEIN; MEYER, 2006) e bacterianas (NIELSEN et al., 2004). Os compostos deste grupo apresentam baixo peso molecular e estrutura baseada em três anéis fenólicos (Figura 4) (AHERNE; O'BRIEN, 2002). Algumas substâncias como a pinocembrina e chartaceona mostraram efeito na inibição da entrada do vírus da imunodeficiência humana (tipos HIV-1 e HIV-2) (LI et al., 2000), além de efeitos inibindo a infecção de Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) em células Vero (FRIEDMAN, 2007) e, inibindo a replicação do vírus da dengue tipo 2 (DENV-2) (SENTHILVEL et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014). Entretanto, apesar das inúmeras vantagens que os compostos naturais apresentam, algumas desvantagens como dificuldade de acesso, purificação e produção em larga escala, complexidade da estrutura química, produto não patenteável (LAM, 2007; SINGH; BARRETT, 2006), fazem com que alternativas mais viáveis sejam investigadas.

Figura 4: Estrutura química básica de um flavonoide. Adaptado de (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006)



Precursores biossintéticos dos flavonoides, as chalconas são substâncias que também vem demonstrando enorme potencial terapêutico (MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015). São caracterizadas pela coloração amarelada e possuem somente dois anéis fenólicos em sua estrutura (DORNAS et al., 2008). As chalconas apresentam atividades biológicas antifúngicas (DIMMOCK et al., 1999), anti-leshmania (DE MELLO et al., 2014) e foram descritas também com atividade antiviral contra vírus

influenza A, do tipo H1N1 (DAO; LINTHORST; VERPOORTE, 2011) e HIV (DENG et al., 2006).

Dessa forma, o desenvolvimento de compostos sintéticos baseados nas estruturas químicas dos compostos naturais tem sido uma alternativa em empresas farmacêuticas (HARVEY, 2008). Os compostos sintéticos por serem produzidos em laboratório, solucionaram as principais desvantagens dos compostos naturais, por serem mais fáceis de serem produzidos em larga escala, poderem ser patenteados (GANESAN, 2004). Além disso, o uso de tecnologias como espectrometria de massa e bancos de dados *ad hoc*, permitem a produção de substâncias sintéticas com estruturas químicas direcionadas a um fim específico (ABERLE; CREWS, 2012; OLIVON et al., 2017).

1.4.1 Compostos sintéticos: Hidroxichalconas e Curcuminoides

As hidroxichalconas, principais substâncias da família das chalconas, podem ser encontradas na natureza ou preparadas sinteticamente (NAKAMURA et al., 2003). Estas também apresentam atividades anticancerígenas, antivirais (LALL; HUSSEIN; MEYER, 2006) e antibacterianas (BENTES et al., 2011) documentadas. Diferentes hidroxichalconas naturais ou sintetizadas mostraram efeito na replicação do herpesvírus humano (HHV-1), DENV-2 e do vírus da hepatite B (HBV) (BRANDÃO et al., 2010). As diversas substâncias da família das hidroxichalconas são sintetizadas por meio de alterações funcionais e estruturais no número e na posição de grupos hidroxila na cadeia de anéis fenólicos (CIESEK et al., 2011), produzindo efeitos biológicos diferentes (NOWAKOWSKA, 2007).

Os curcuminoides, outra classe de grande importância na medicina tradicional, são pigmentos polifenólicos encontrados em raízes da planta Cúrcuma (*Curcuma longa* L, Zingiberaceae) a qual pertence à família do gengibre (*Zingiberaceae*) (GONZÁLEZ ALBADELAJO et al., 2015). Os compostos derivados dessa família têm apresentado inúmeros efeitos, dentre eles, o antiviral (PRASAD; TYAGI, 2015). A curcumina, principal representante do grupo apresentou citotoxicidade seletiva pelos tipos HPV-16 e 18, além de diminuir a expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV (PAULRAJ et al., 2015). Esta substância ainda tem mostrado um efeito anti-HPV em estudos *in vitro* de células de câncer cervical e oral (MISHRA; DAS, 2015). Além do mais, apresentaram efeito antiviral contra outros tipos de vírus, por exemplo, inibindo a replicação e a entrada do vírus da hepatite C (HCV) (ZHU et al., 2008), inibindo a replicação do HBV (QIN et

al., 2014), impedindo a entrada do vírus HIV-1 em células *in vitro*, além de propriedades contra o HSV e o vírus da estomatite vesicular (VSV) (PRASAD; TYAGI, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desta maneira, o presente trabalho buscou avaliar a atividade de hidroxichalconas e curcuminoides sintéticos na infecção do HPV *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Produção de pseudovírus expressando as proteínas do capsídeo L1 e L2 do HPV para a infecção e tratamento das células;
- Avaliar a citotoxicidade de hidroxichalconas e curcuminoides sintéticos na linhagem 293T;
- Avaliar atividade antiviral de hidroxichalconas e curcuminoides sintéticos contra pseudovírus de HPV em linhagem 293T.

3. METODOLOGIA

3.1 Compostos

As hidroxichalconas (T1, T2, T3, T4, T6, T7, T8, T9, T10, T10B, T11, T11A, T11B, T11C, T11D, T14, T23, T26, T31, T32, T35, T36, T37 e T45) e os curcuminoides (CH1, CH2, CH5, AC7 e AC10) sintéticos avaliados neste estudo foram cedidos gentilmente pelo grupo de pesquisas do Prof. Dr. Luís Octávio Regasini Laboratório de Química Verde e Medicinal da UNESP de São José do Rio Preto/SP. Os compostos foram dissolvidos em dimetil-sulfóxido (DMSO) e mantidos em solução estoque a -80 °C.

3.2 Cultura de células 293T

Células da linhagem 293T foram cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) e suplementado com 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (GIBCO-BRL) e 50 µg/ml de geneticina (Sigma-Aldrich®) e, incubados a 37°C e 5% de CO₂.

3.3 Produção de pseudovírus

As células 293T foram transfectadas com os DNAs referentes às construções p16sheLL (contém o gene para as proteínas L1 e L2 do capsídeo do HPV) e pCIneoEGFP (contém o gene para proteína fluorescência verde EGFP) usando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 48 horas. Posteriormente foi realizado o procedimento de maturação e lise das células, de acordo com o protocolo (CENTER FOR CANCER RESEARCH, 2015). O sobrenadante contendo os pseudovírus foi coletado e estocado a -80°C, de acordo com o protocolo (LABORATORY OF CELLULAR ONCOLOGY, 2015). Os plasmídeos usados nesses ensaios foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart da Universidade Federal de Uberlândia.

Para quantificar os pseudovírus, células 293T foram plaqueadas em microplacas de 96 poços na concentração de 1x10⁴ células/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, foram realizadas diluições de pseudovírus em meio DMEM a 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado (GIBCO-BRL), partindo da concentração de 1 : 1000 até 1 :100 (pseudovírus : DMEM) e adicionados às células. As placas permaneceram

incubadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. As leituras dos ensaios foram feitas por detecção de EGFP em microscópio de fluorescência, no aumento de 20x e filtro GFP (azul).

3.4 Ensaio de viabilidade celular

Para estabelecer a concentração não tóxica dos compostos, células 293T foram plaqueadas em microplacas de 96 poços na concentração de 1×10^4 células/poço e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, os compostos foram diluídos em meio DMEM, nas concentrações de 50µM e 10µM e adicionados imediatamente às células. O DMSO 0,1% foi utilizado como controle não tratado. As placas permaneceram incubadas por 72 horas a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 100µL da solução contendo 1mg/ml de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich®) em DMEM foi adicionado às células, que foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A solução de MTT foi removida, substituída pelo mesmo volume de DMSO e submetida à leitura de absorbância (570 nm), em leitor de placa. A porcentagem da viabilidade celular foi determinada pela média dos poços tratados x 100/ média dos poços controle. O ensaio foi realizado em triplicata e em pelo menos dois eventos independentes.

3.5 Ensaio de infecção por pseudovírus

Para avaliar a atividade antiviral dos compostos, as células 293T foram cultivadas em microplacas de 96 poços na concentração de 1×10^4 células/poço. No dia seguinte, os pseudovírus de HPV na concentração de 1 : 500 (pseudovírus : DMEM) foram adicionados às células na presença ou ausência dos compostos e o DMSO foi utilizado como controle não tratado. Após 72 horas de incubação, as taxas de inibição foram analisadas por detecção de EGFP em microscópio de fluorescência (contagem de focos). Após a leitura de fluorescência foi realizado logo após um novo ensaio de viabilidade celular a fim de avaliar a citotoxicidade do composto associado ao pseudovírus após as 72h.

3.6 Análise estatística

Todos os dados foram expressos por meio de média e desvio padrão. A análise estatística das diferenças foi determinada por meio de teste estatístico de análise de

variância (one-way e two-way ANOVA) e teste de Dunnett utilizando o software GraphPrismo, onde valores de $p < 0.001$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para avaliar o efeito citotóxico de cada composto nas concentrações de 50 μ M e 10 μ M em linhagem celular 293T. Os compostos da família das hidroxichalconas T1, T2, T3, T4, T7, T9, T10B, T11, T11B, T11C, T11D, T23, T26, T31, T32, T34, T37 e T45 na concentração de 50 μ M se mostraram tóxicos, com uma viabilidade menor ou igual a 50%. Os compostos T1, T2, T3, T4, T7, T9, T11, T11B, T11C, T11D, T23, T26, T34, e T45, na concentração de 10 μ M se mostraram viáveis a uma taxa igual o maior de 80%. Alguns compostos como T6, T8, T11A, T14, T35 e T36 foram viáveis às células em ambas as concentrações (50 e 10 μ M). Entretanto, os compostos T10B, T31, T32 e T37 se apresentaram tóxicos nas duas concentrações testadas (Figura 5a e 5b).

Para a família dos curcuminoides, todos os compostos (CH1, CH2, CH5, AC7 e AC10) foram tóxicos para as células na concentração de 50 μ M, e na concentração de 10 μ M apenas os compostos CH1, Ac7 e Ac10 foram viáveis a uma taxa acima de 80% (Figura 5b). A partir desses ensaios, foram selecionados os compostos com viabilidade celular acima de 80% (Tabela 1).

Figura 5: Ensaio de viabilidade celular para hidroxichalconas e curcuminoides. Células 293T foram tratadas por 72h nas concentrações de 50 μ M e 10 μ M dos compostos T1 a 14 (a) e T23 a Ac10 (b). A linha contínua corresponde a 100% de viabilidade celular e, a linha pontilhada (....) corresponde a 80% de viabilidade celular e, a linha pontilhada corresponde a 80% da viabilidade. DMSO 0,1% foi utilizado como controle não tratado.

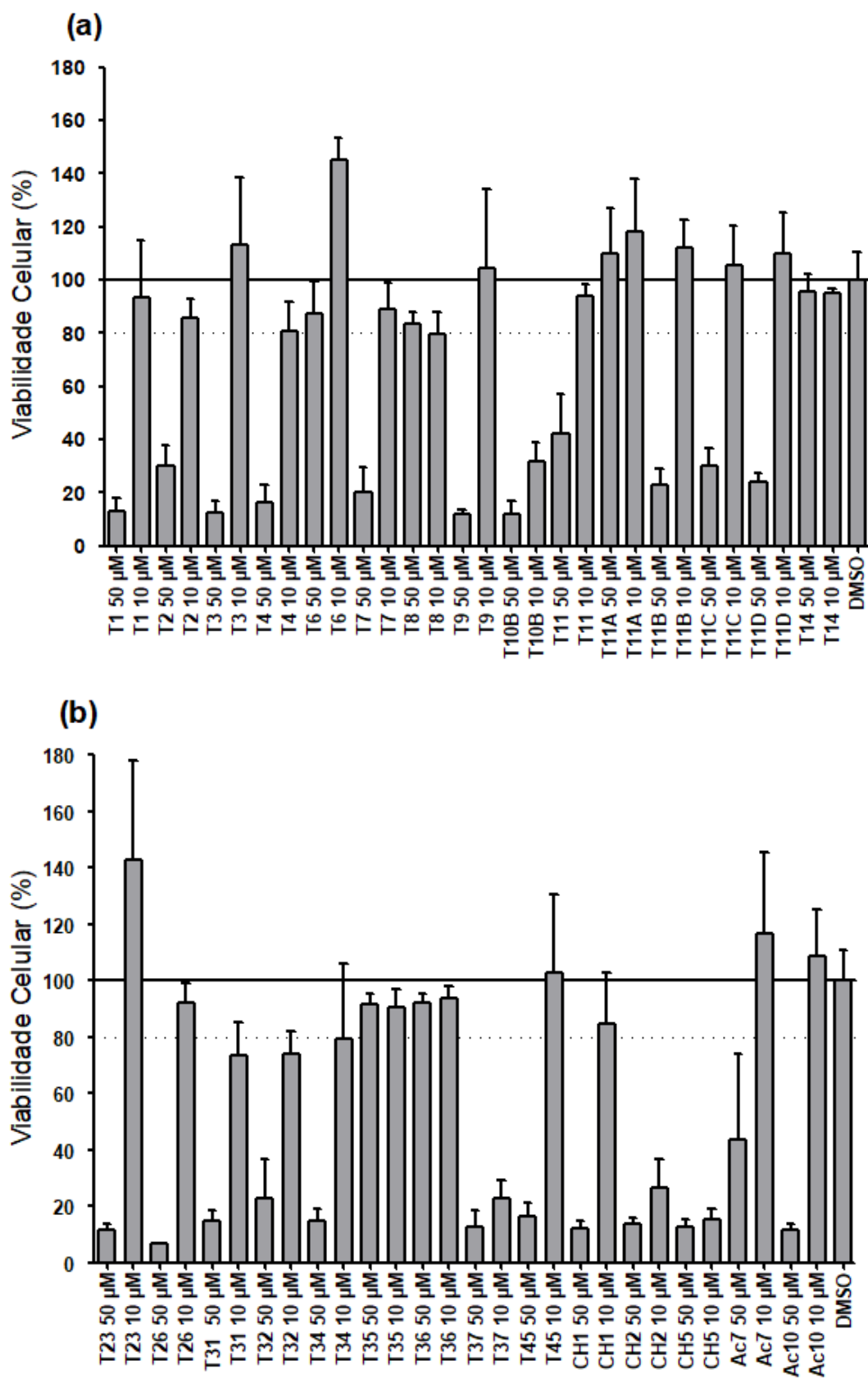


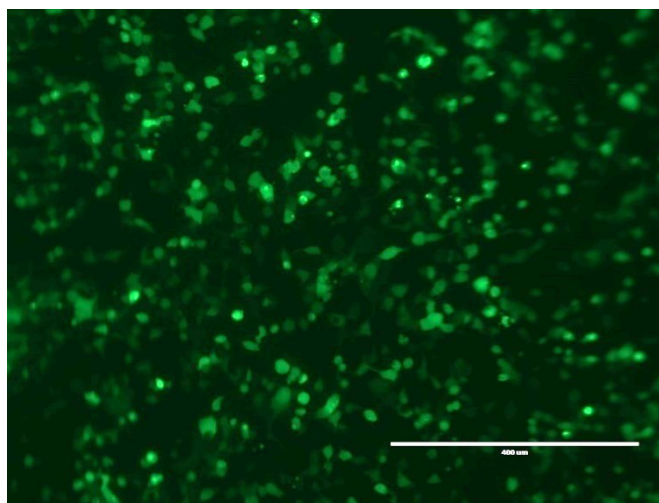
Tabela 1: Viabilidade celular dos compostos selecionados para ensaio de infecção e as concentrações determinadas como não-citotóxicas.

Composto Selecionado	Concentração (μM)	Viabilidade Celular (%)
T1	10	93,69
T2	10	85,97
T4	10	80,64
T6	50	87,65
T7	10	89,04
T8	50	83,79
T9	10	104,55
T11	10	94,24
T11A	50	109,92
T11C	10	105,39
T11D	10	110,00
T14	10	94,93
T26	10	91,94
T35	50	90,3
T36	50	92,2
T45	10	103,04
CH1	10	84,89
AC10	10	108,56

4.2 Produção de pseudovírus

Células 293T foram transfectadas com os plasmídeos que expressaram EGFP, e a expressão e detecção da fluorescência foi confirmada por meio de microscopia. A presença da fluorescência indicou que a transfecção foi bem-sucedida (Figura 6), permitindo a continuação do protocolo até a maturação e a coleta dos pseudovírus.

Figura 6: Células 293T transfectadas com os plasmídeos p16Shell e PCIneoGFP, observadas em microscópio de fluorescência com objetiva de 10X e com filtro GFP. Escala 400 micrometros.



4.3 Ensaio antiviral

As células foram infectadas com os pseudovírus na presença ou ausência dos compostos selecionados nas concentrações viáveis mais altas, determinadas a partir dos ensaios de viabilidade celular. Os compostos T2, T6, T11A, T11C, T14, T35, T45 e CH1, apresentaram uma inibição da entrada do vírus na célula de 18%, 19%, 18%, 14%, 10%, 23%, 5,5% e 11%, respectivamente (Figura 7). Já os compostos T1, T7, T8, T9, T11, T11D apresentaram taxas mais elevadas na inibição da infecção de 31%, 37%, 42%, 35%, 39% e 36%, respectivamente (Figura 7). Após a leitura de fluorescência foi realizado um novo ensaio de viabilidade celular a fim de avaliar a citotoxicidade do composto associado ao pseudovírus após 72h. Nos ensaios de infecção, os compostos T4, T26, T36 e AC10 apresentaram elevada citotoxicidade (Figura 8). Quando comparados, os valores de viabilidade celular dos compostos T4, T26, T36 e AC10 na presença de pseudovírus com os resultados de viabilidade celular obtidos na ausência dos pseudovírus, foi possível observar que juntos, as pseudopartículas e o composto, apresentaram uma citotoxicidade inesperada (Figura 9). A viabilidade celular dos compostos T4, T26, T36 e AC10 na presença de pseudovírus teve uma diminuição de 38%, 25%, 77% e 53% respectivamente.

Figura 7: Infectividade dos pseudovírus de HPV (%) e viabilidade celular após o tratamento (%). DMSO 0,1% foi utilizado como controle não tratado e infectado com pseudovírus de HPV (DMSO). Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em quadriplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados. P <0,001 foi considerado significativo (***)

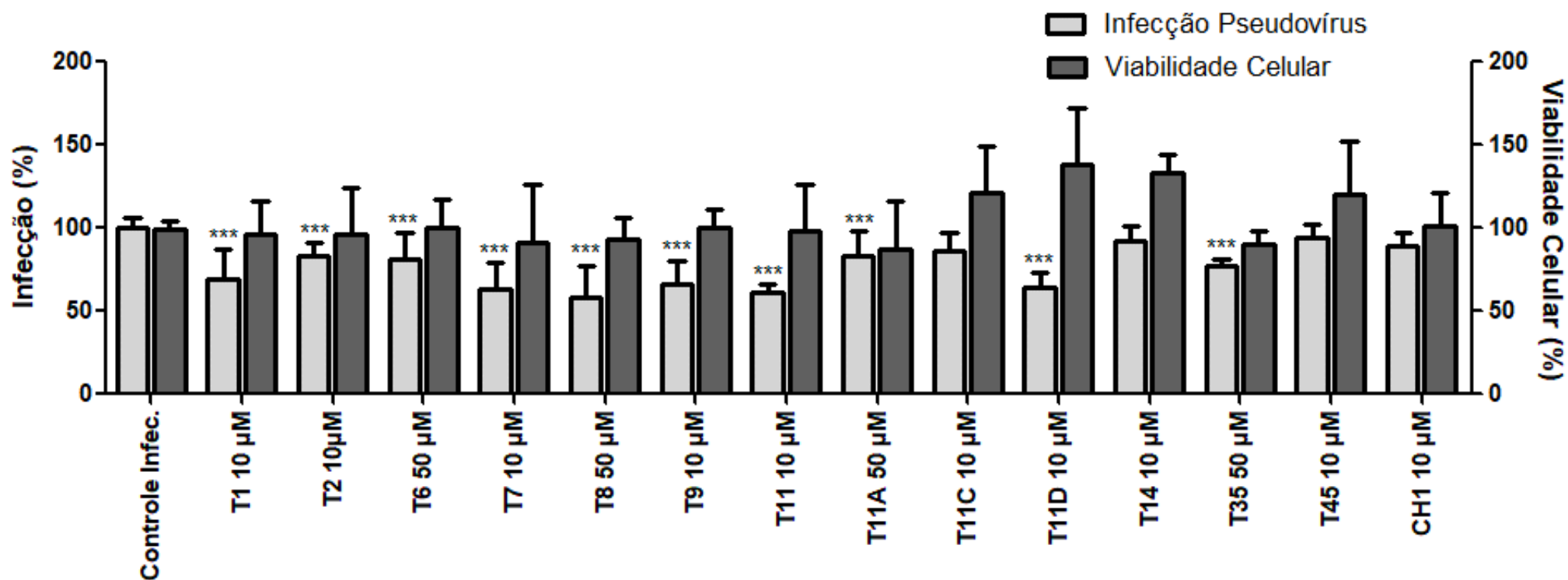


Figura 8: Comparação das células nos ensaios de infecção com controle não infectado (A), controle infectado (B), citotoxicidade dos compostos T4 (C), T26 (D), T36 (E) e AC10 (F).

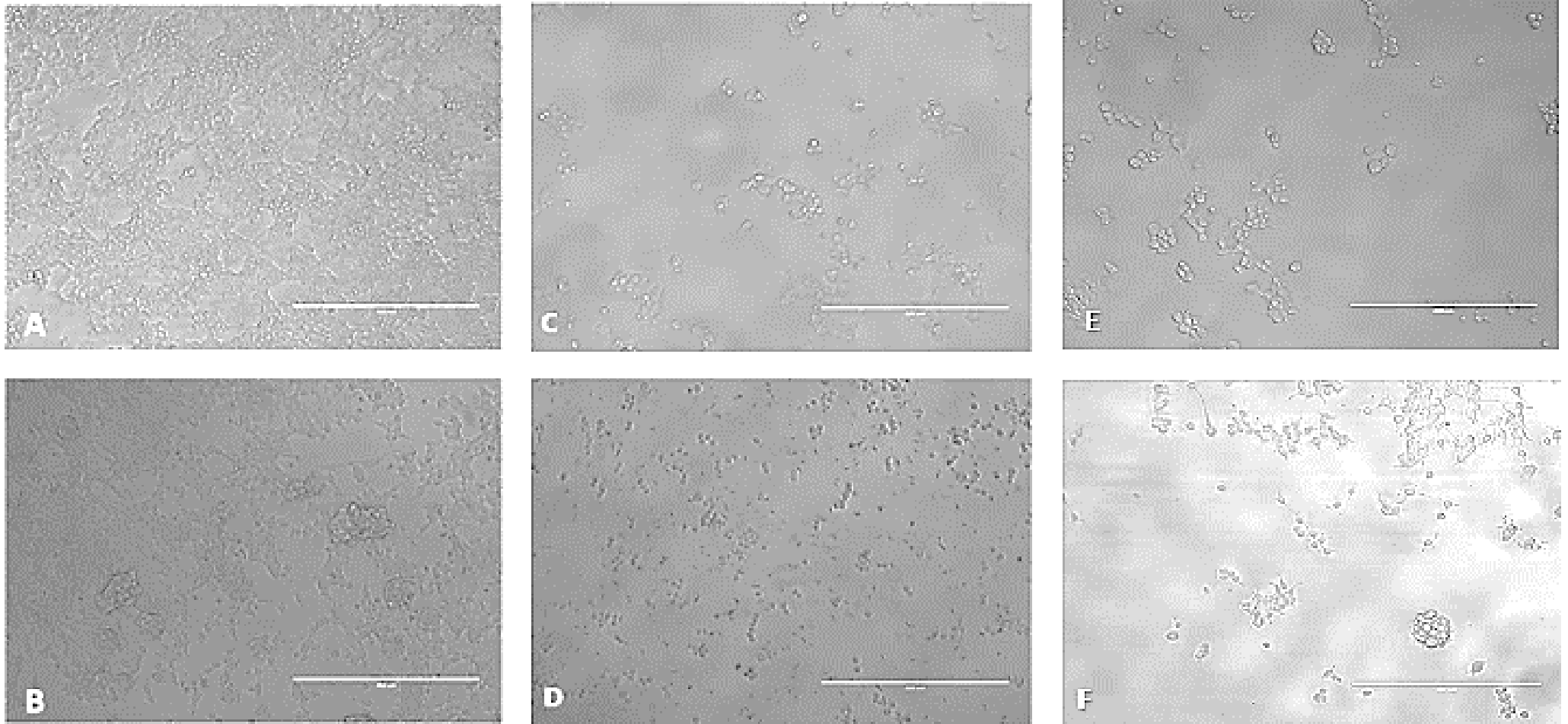
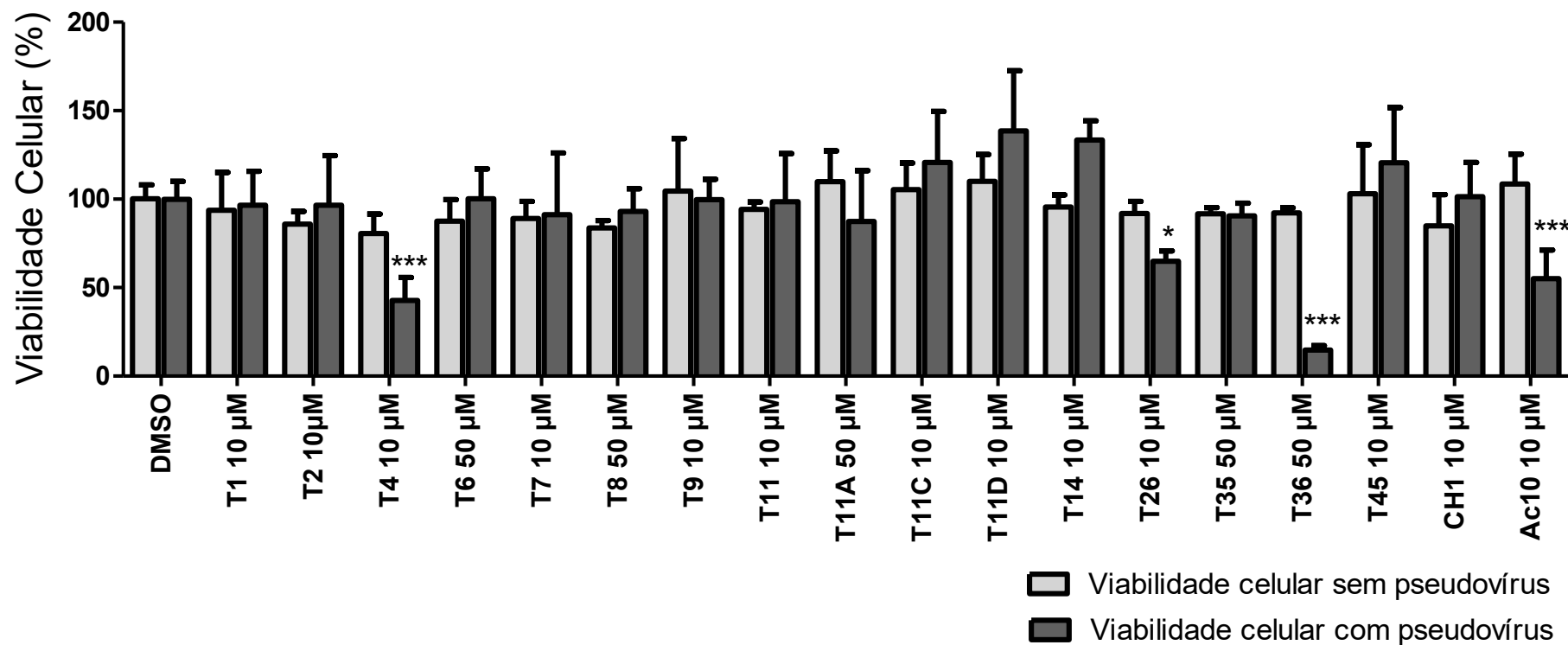


Figura 9: Viabilidade celular dos compostos testados na presença ou na ausência dos pseudovírus (%). DMSO 0,1% foi utilizado como controle não tratado. Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em quadruplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados.



5. DISCUSSÃO

O HPV permanece como um dos responsáveis por uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns e tem alertado às autoridades devido aos altos índices (54,6%) desse vírus circulando entre jovens brasileiros de 16 a 25 anos (ONU-BR, 2017). Sendo assim, a necessidade de tratamentos para a infecção viral se torna cada vez mais urgente.

Compostos sintéticos, como os análogos sintéticos da curcumina (3,5-bis(arylmetileno)-1-(N-(ortho-substitutedaryl)maleamoyl)-4-piperidonas), têm mostrado efeito anti-HPV (JHA et al., 2015; MISHRA; DAS, 2015), e tem atraído grande interesse na área biomédica pela facilidade de produção em larga escala, tem atraído grande interesse na área biomédica. Estudos demonstraram que os curcuminoides e as hidroxichalconas têm apresentado interessantes atividades biológicas significativas, sem oferecer elevada citotoxicidade celular (DONG et al., 2017; YANG et al., 2016). Entretanto, no presente estudo, os compostos sintéticos da família das hidroxichalconas T10B, T31, T32 e T37, e curcuminoides CH2 e CH5 apresentaram alta citotoxicidade, mesmo na concentração de 10 μ M, impossibilitando o ensaio antiviral para a maioria dos compostos.

Os compostos sintéticos da família dos curcuminoides têm mostrado efeito anti-HPV na replicação do vírus *in vitro* em células de câncer oral e bucal, inibindo a transcrição das proteínas E6 e E7 do HPV 16 e restaurando a expressão de proteínas supressoras de tumores como a p53 (MISHRA; DAS, 2015). Maher e colaboradores observaram que o efeito apresentado por curcuminoides parece estar ligado à citotoxicidade do composto às células, visto que além de suprimir as proteínas oncogênicas do HPV, a curcumina consegue eliminar células cancerígenas através da restauração da proteína p53 (MAHER et al., 2011). Nossos resultados demonstraram que o curcuminóide Ac10 também apresentou citotoxicidade para as células 293T, porém não podemos afirmar que a citotoxicidade observada nos ensaios de infecção possa estar associada a um efeito antitumoral, visto que a linhagem celular utilizada neste estudo não deriva de linhagens cancerígenas.

No estudo de Cagno e colaboradores foram utilizados também os pseudovírus do HPV para avaliar o efeito de composto AGMA1, polímero produzido sinteticamente contendo Agmatina, na entrada do vírus em células 293T. O composto AGMA1 teve efeito em diferentes etapas da entrada do vírus, se ligando as células ou as pseudopartículas virais, porém, não foi relatado a citotoxicidade do pseudovírus na

presença do composto (CAGNO et al., 2015). Diferentemente desse estudo, durante o ensaio de infecção com nossos compostos T4, T26, T36 e AC10 na presença do pseudovírus, ocorreu uma diminuição da viabilidade celular, e não foi observada uma potente atividade antiviral pelo tratamento com esses compostos.

No presente estudo, os compostos T7, T8, T11, T11D apresentaram as maiores taxas de inibição observadas (37%, 42%, 39% e 36%, respectivamente). Esses dados corroboram com outros estudos, que demonstraram que compostos das classes das hidroxichalconas tem apresentado efeito contra diversos tipos de vírus como o HSV-1 e DENV-2 (BRANDÃO et al., 2010).

O sistema de pseudovírus do HPV utilizado nesse estudo, permitiu a avaliação da ação dos compostos sintéticos na etapa de entrada do HPV na célula. Portanto, novos estudos são necessários para avaliar as outras etapas do ciclo replicativo viral.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que dentre as hidroxichalconas testadas, as T7, T8, T11 e T11D apresentaram as maiores taxas de inibição de infecção. Enquanto os curcuminoides CH1, CH2, CH5, AC7 e AC10 não demonstraram efeito significativo contra a infecção do HPV. Mais estudos são necessários para confirmar se esses compostos apresentam efeito em outras etapas do ciclo replicativo do HPV.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PROTEÍNAS ISOLADAS DE VENENO DE SERPENTES BRASILEIRAS NO CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi descoberto em 1950 na Tanzânia, e é responsável pela febre Chikungunya, causando fortes dores nos músculos e articulações, febre e náuseas. De acordo com a Organização de Saúde Pan Americana (PAHO), no ano de 2017, foram confirmados cerca de 120.000 casos de febre Chikungunya nas Américas. O grande problema da infecção consiste da possibilidade de cronificação. A doença tem caráter endêmico e não possui tratamentos específicos ou profiláticos, como as vacinas. O tratamento é feito a partir de medidas paliativas com analgésicos e antitérmicos. Neste contexto, compostos naturais podem fornecer uma fonte alternativa para a identificação de produtos com potencial terapêutico. Compostos originários de venenos animais têm demonstrado atividade antiviral contra outros vírus, como por exemplo, os vírus causadores da dengue (DENV), da febre amarela (YFV) e do sarampo. Além disso, alguns tratamentos atuais como o de hipertensão tiveram como base compostos isolados de veneno de serpente. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de proteínas isoladas do veneno de serpentes do gênero *Crotalus sp* e *Bothrops sp* no ciclo replicativo do CHIKV *in vitro*. Foram realizados ensaios de viabilidade celular e infectividade em células BHK-21, e ensaios de replicação em células BH-21 expressando o replicon subgenômico CHIKV-NCT. Os resultados demonstraram que a proteína PLA apresentou atividade antiviral estatisticamente significativa, inibindo 81% da infectividade do CHIKV. Esse estudo demonstrou pela primeira vez a atividade da proteína PLA no ciclo replicativo do CHIKV, e propõe uma nova substância como promissora forma de combate ao vírus.

ABSTRACT

The Chikungunya virus (CHIKV) was discovered in Tanzania in 1950 and is responsible for Chikungunya fever, causing severe muscle and joint pain, fever and nausea. According to the Pan American Health Organization (PAHO), in the year 2017, about 120,000 cases of Chikungunya fever in the Americas were confirmed. The major problem with infection is the possibility of chronification. The disease is endemic and has no specific or prophylactic treatments, such as vaccines. The treatment is made from palliative measures with analgesics and antipyretics. In this context, natural compounds may provide an alternative source for the identification of products with therapeutic potential. Compounds originating from animal poisons have demonstrated antiviral activity against other viruses, such as dengue virus (DENV), yellow fever (YFV) and measles. In addition, some current treatments such as hypertension were based on isolated compounds of snake venom. Therefore, the present work had as objective to evaluate the activity of proteins isolated from venom of snakes of the genus *Crotalus sp* and *Bothrops sp* in the replicative cycle of CHIKV *in vitro*. Cell viability and infectivity assays were performed on BHK-21 cells, and replication assays on BH-21 cells expressing the CHIKV-NCT subgenomic replicon. The results demonstrated that the PLA protein showed statistically significant antiviral activity, inhibiting 81% of the CHIKV infectivity. This study demonstrated for the first time the activity of the PLA protein in the replicative cycle of CHIKV, and proposes a new substance as a promising form of fighting the virus.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus* (GAY et al., 2016; ROSS, 1955). É um vírus envelopado, com aproximadamente 70nm de diâmetro e uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11.8 kB (ROBERTS et al., 2017; SOLIGNAT et al., 2009) (Figura 10). O genoma viral codifica 4 proteínas não estruturais (nsP1-nsP4) relacionadas ao complexo replicativo, e 5 proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K), presentes no capsídeo ou envelope do vírus (LUM; NG, 2015) (Figura 11).

Figura 10: Organização estrutural do vírus CHIKV. Adaptado de Instituto de Bioinformática da Suíça. Fonte: (http://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species)

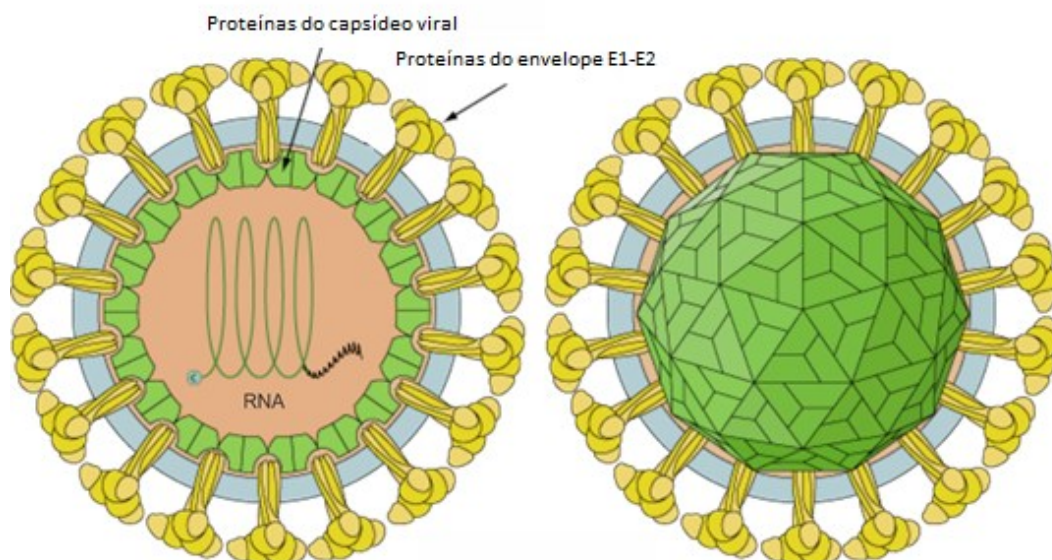
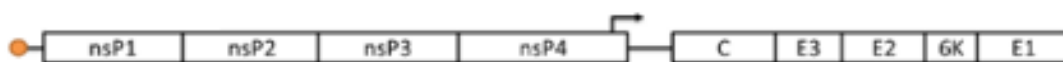


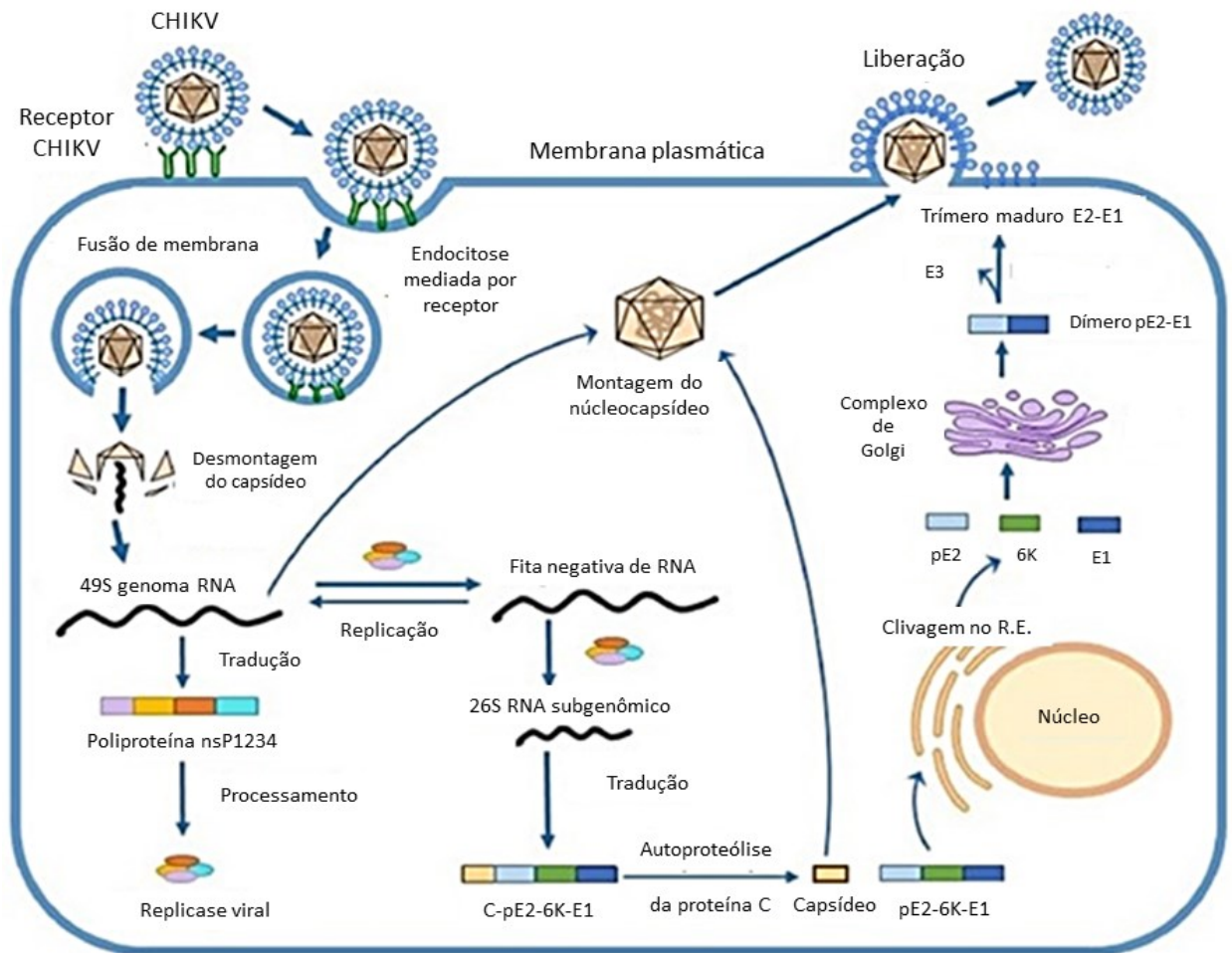
Figura 11: Exemplificação do genoma do vírus Chikungunya. Adaptado de (ROBERTS et al., 2017).



O ciclo replicativo do vírus se divide entre células de hospedeiros vertebrados e as células de artrópodes, sendo assim classificada como uma arbovirose (BORGHERINI et al., 2007). A replicação viral se inicia pela adsorção do vírus, ou seja, pela ligação entre a proteína E2 do envelope viral e receptores da membrana da célula hospedeira, que promove a entrada do vírus por endocitose. O pH se torna ácido no interior do endossomo, provocando mudanças conformacionais que permitem a fusão entre a membrana do

endossomo e do envelope viral. Esse processo é mediado por E1, promovendo a liberação do capsídeo viral no citoplasma da célula e posterior liberação do RNA viral. O RNA de polaridade positiva é rapidamente traduzido em uma poliproteína não-estrutural (NSP1234), posteriormente clivada, formando NSP123 e NSP4. Estas, ao interagirem com proteínas do hospedeiro, formam um complexo conhecido como Replicase Viral, o qual é responsável por produzir uma fita RNA polaridade negativa a partir do RNA de polaridade positiva, e produzir um RNA subgenômico a partir da segunda região de leitura aberta que será utilizado com RNAm para sintetizar uma poliproteína estrutural do vírus (C-pE2-6K-E1). A poliproteína estrutural é clivada por auto proteólise em proteína C do capsídeo (proteínas de automontagem), e as proteínas do complexo E2-6K-E1 são processadas no retículo endoplasmático e serão inseridas na membrana da célula hospedeira. Finalmente, os capsídeos formados se agrupam no citoplasma e deixam as células por brotamento, levando a região da membrana celular com as proteínas E1 e E2, como seu envelope viral (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; GOULD et al., 2010; SOLIGNAT et al., 2009) (Figura 12).

Figura 12: Esquema representativo da replicação do vírus Chikungunya. Adaptado de (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015).



O CHIKV é transmitido a partir da picada de mosquitos fêmeas infectados pelo CHIKV, sendo os principais vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (NGOAGOUNI et al., 2017; POWERS et al., 2000). Nos últimos anos o CHIKV tem ganhado destaque devido ao aumento de surtos em todo o mundo, principalmente nas Américas (W.H.O., 2017). Nas Américas o clima majoritariamente tropical, facilita o aumento da densidade de mosquitos e com isso, a transmissão do vírus, especialmente em períodos chuvosos (MAVALE et al., 2010). Associado a isso, existem outros vetores os quais possuem alta susceptibilidade pelo vírus, podendo facilitar novos surtos da doença (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017). A transmissão vertical do CHIKV é classificada como rara mas com altas taxas de morbidade infantil, porém foi relatado o primeiro caso de morte do recém-nascido no Brasil, após infecção por CHIKV (OLIVEIRA et al., 2018).

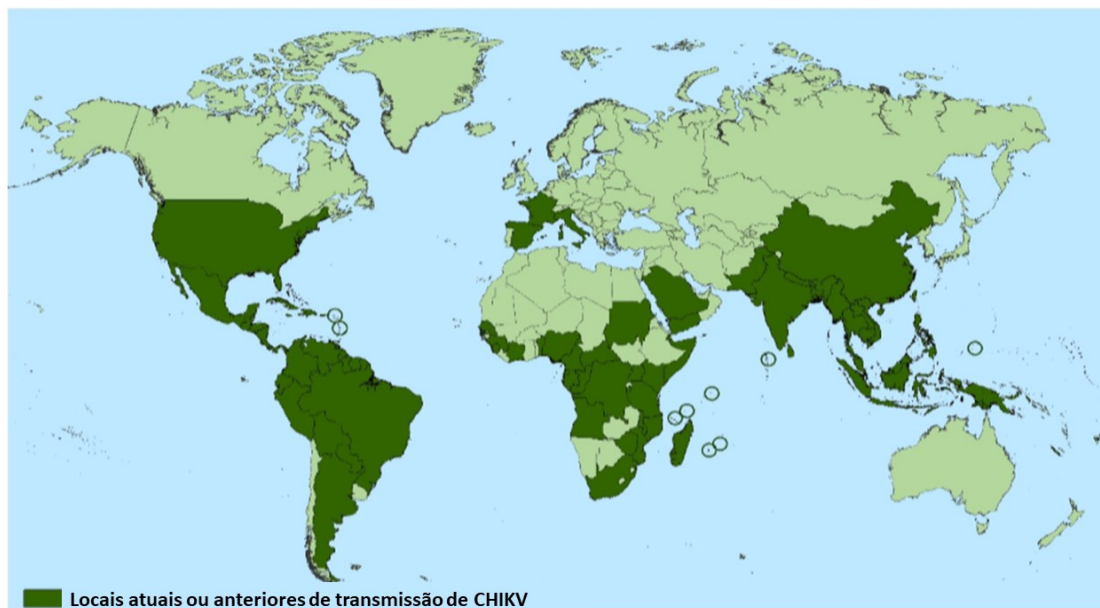
1.2 Febre Chikungunya

Após a picada por um mosquito infectado, o CHIKV é liberado na corrente sanguínea e na derme, inicialmente infectando células suscetíveis ao vírus como as do tecido conjuntivo, células epiteliais e fibroblastos (THON-HON et al., 2012). Através da circulação linfática e sanguínea, o vírus atinge sítios de infecção secundários, como fígado, articulações e tecidos musculares (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). Os sintomas gerais causados pela infecção do CHIKV são febre aguda, náuseas e fadiga (LUMSDEN, 1955). Entretanto, os processos inflamatórios causados pela persistente replicação viral e a resposta imune do hospedeiro, resultam em manifestações de mialgia e poliartralgia em articulações distais, provocando fortes dores articulares e musculares (SILVA et al., 2017). Os sintomas gerais são muito semelhantes aos de outras arboviroses como a dengue, porém as fortes dores nas articulações são características da infecção (LEE et al., 2012). Além disso, em alguns casos raros são observadas encefalopatias, hepatites e miocardites, podendo também levar a óbito (DAS et al., 2010). Apesar de ser ocasionalmente assintomática, na maioria dos casos seus sintomas estão presentes e podem se tornar crônicos, permanecendo de alguns meses até anos, e causando limitações nos movimentos (ALESSANDRA LO PRESTI et al., 2014; PIALOUX G, GAÜZÈRE BA, JAURÉGUIBERRY S, 2007).

1.3 Epidemiologia

O CHIKV foi descoberto em 1950 na região da Tanzânia e descrito pela primeira vez em 1952-53 (HALSTEAD, 2015; LUMSDEN, 1955), porém era restrito a regiões da África e Ásia, com alguns surtos esporádicos (COHEN et al., 1969; NJENGA et al., 2008). A identificação do CHIKV como o agente etiológico da febre do Chikungunya ocorreu somente em 1955 (ROSS, 1955; WEAVER; FORRESTER, 2015). Em 2005, um surto global teve início com alguns casos em ilhas do oceano Índico e, devido a intensa circulação de pessoas na região, casos foram notificados em outros países como Itália e França (RAVI, 2006; SAMBRI et al., 2008). O surto atingiu também as Américas, onde se espalhou com grande facilidade em consequência do clima favorável e a presença de vetores suscetíveis (Figura 13) (GRATZ, 2004; PAGÈS et al., 2009; RASHAD; MAHALINGAM; KELLER, 2013).

Figura 13: Países que registraram casos de Chikungunya de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Não estão inclusos países e/ou territórios onde foram identificados somente casos importados. Adaptado de (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2018).



Um estudo filogenético identificou que uma linhagem comum deu origem a duas cepas distintas, sendo uma a do Oeste Africano (WA) e outra do Leste/Centro/Sul da África (ECSA) (VOLK et al., 2010). A ocorrência de um surto cerca de 70 a 150 anos atrás na Ásia causado pela cepa ECSA, levou a uma diferenciação de um genótipo diferente, conhecido como a linhagem Asiática (BURT et al., 2017; VOLK et al., 2010). No Brasil, os primeiros casos da febre do Chikungunya foram relatados no Amapá e Bahia, sendo rapidamente difundida por todos os estados, causados pelas cepas ECSA e Asiáticas (SILVA et al., 2017). Desde então, essas cepas foram responsáveis por mais de 47.000 casos nos anos de 2014-2015 e mais de 63.000 casos confirmados até o ano de 2016 (SILVA et al., 2018). No ano de 2018, até a semana epidemiológica 23 foram registrados 47.791 casos prováveis de febre Chikungunya com uma incidência de 23 casos/100 mil habitantes (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

1.4 Tratamento e profilaxia

O tratamento para a febre Chikungunya atualmente é focado em paliativos como analgésicos, antitérmicos, repouso e hidratação, visto que não existem antivirais aprovados para uso clínico (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE

VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015; OMS, 2017). Além disso, também não existem vacinas capazes de levar a uma imunização satisfatória da população (ROUGERON et al., 2015).

1.5 Compostos naturais

Os produtos naturais sempre tiveram importante papel na produção de temperos, inseticidas e principalmente fármacos, dada a diversidade de substâncias químicas com estruturas variadas, permitindo a sobrevivência de diversas populações ao clima e às doenças (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). Os compostos naturais podem ser derivados de plantas, micróbios e animais (GANESAN, 2008), e suas atividades biológicas têm desencadeado a produção de fármacos para tratamento de várias doenças como câncer, diabetes e infecções, por serem facilmente absorvidas pelo organismo e possuírem ligações químicas mais fortes (HARVEY, 2008). Entre 1994 a 2007, mais da metade dos fármacos aprovados para uso foram baseados em produtos naturais (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014).

1.5.1 Toxinas de animais

As peçonhas de serpente tem sido uma fonte terapêutica inovadora, por ser uma mistura complexa entre metalo-proteínas, fosfolipases e enzimas proteolíticas (BAILEY; WILCE, 2001; FABIAN VILLALTA-ROMERO, 2017). O isolamento e identificação de algumas dessas moléculas e/ou proteínas, permitiram a identificação de um peptídeo do veneno da *Bothrops jararaca*, responsável pela inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), que hoje é utilizado como agente anti-hipertensivo (captopril) (ONDETTI et al., 1971; RUPAMONI THAKUR; ASHIS K. MUKHERJEEA, 2017). Além disso, algumas proteínas isoladas do veneno de serpentes têm demonstrado atividade antiviral contra DENV-2 e DENV-3, vírus da imunodeficiência humana (HIV), YFV, vírus da hepatite C e vírus mayaro (CLEYSE et al., 2017; MULLER et al., 2014; SHIMIZU et al., 2017; VERA L. PETRICEVICH; RONALDO Z. MENDONÇA, 2003). Sendo assim, as substâncias provenientes de animais como as serpentes peçonhentas têm apresentado potencial terapêutico significativo. A utilização de proteínas isoladas do veneno de serpentes, como alternativa para o desenvolvimento de novos antivirais vem sendo estudadas para outros vírus, porém pouco se sabe sobre a ação dessas no mecanismo replicativo do CHIKV.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de proteínas isoladas do veneno de serpentes do gênero *Crotalus sp* e *Bothrops sp* no ciclo replicativo do CHIKV *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade das proteínas selecionadas por ensaios de viabilidade celular (MTT) para selecionar a melhor concentração viável;
- Avaliar o potencial inibitório das proteínas selecionadas na replicação do CHIKV *in vitro*.

3. METODOLOGIA

3.1 Compostos

O veneno bruto de serpentes do gênero *Crotalus sp* e *Bothrops sp* foi obtido a partir do serpentário “Centro de Extração de Toxina Animal” (CETA) devidamente registrado no Ministério do Meio Ambiente, nº 3002678. A extração foi realizada por Jairo Marques do Vale (CETA). O veneno foi coletado de 28 espécimes da coleção Morungaba- SP, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Autorização IBAMA:1/35/1998/000846-1). O isolamento e purificação das 5 proteínas: proteínas 10, 12, 15 e fosfolipase PLA₂ da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops sp*, e a proteína 20 da peçonha de serpentes do gênero *Crotalus sp* que foram utilizadas no projeto, foram realizadas no Laboratório de Toxinologia da Escola de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (autorização IBAMA: 1/35/1998/000846-1), sob supervisão da Prof.^a. Dr.^a Suely Vilela Sampaio. As proteínas foram liofilizadas e dissolvidas em PBS (solução tampão-fosfato), filtradas e armazenadas a -80°C.

3.2 Linhagem Celular BHK-21

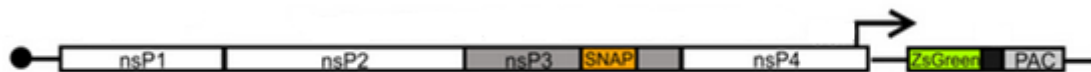
Células BHK-21 proveniente de rim de hamster bebês foram cultivadas em meio essencial mínimo de Glasgow (GMEM, GIBCO-BRLA, Grand Island, NY, USA), suplementado com 1% (v/v) penicilina e streptomina, 1%(v/v) de caldo de triptose fosfato (TBP) e 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado (GIBCO-BRL), e incubadas à 37°C e 5% de CO₂.

3.3 Replicon subgenômico

O sistema de replicon subgenômico em células BHK-21 foi gentilmente cedido pelo Prof Andres Merits do Instituto de Tecnologia da Universidade de Tartu, Estônia. O replicon de CHIKV subgenômico e não citotóxico (CHIKV-NCT) apresenta o “gene reporter” por fluorescência pela expressão da proteína ZsGreen, e a enzima Puromicina-N-Acetiltransferase (PAC) que confere resistência ao antibiótico Puromicina (Figura 14). O replicon subgenômico foi inserido nas células BHK-21 por transfecção e, essas tratadas com Puromicina para selecionar somente células expressando o replicon transfectado. A expressão foi confirmada através de microscópio de fluorescência e, o tratamento

continuado até a produção da linhagem celular estável BHK-21 CHIKV-NCT que foi utilizada nos testes.

Figura 14.: Desenho esquemático do replicon subgenômico CHIKV-NCT, com reporter ZsGreen e enzima PAC. Adaptado de (REMENYI et al., 2018)



3.4 Vírus completo

A construção CMV-CHIKV-LR-GLuc do vírus completo de CHIKV foi produzida a partir do vírus isolado da linhagem ECSA LR2006-OPY1 do CHIKV (VARGHESE et al., 2016) e gentilmente cedida pelo Prof. Andres Merits do Instituto de Tecnologia da Universidade de Tartu, Estônia, para o Laboratório de Virologia da UFU. A construção CMV-CHIKV-LR-GLuc foi transfectadas em células BHK-21 utilizando usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Após 48h, sobrenadante foi coletado e congelado a -20 C° . Posteriormente, o sobrenadante contendo os vírus, foi adicionado à novas células BHK-21, para aumento do título viral, e coletados após 24h. A titulação do vírus completo foi realizada por meio de ensaio de formação de placa em células BHK-21. As células foram plaqueadas 16h antes do ensaio em placas de 6 poços na concentração de 5×10^5 células/poço. Diluições em série de 10^{-3} a 10^{-8} do estoque de vírus foram feitas em meio de infecção, adicionadas as células e incubadas durante 1h. A solução de vírus foi removida, e substituída por 2mL de meio GMEM contendo 1% de metil celulose. As células foram incubadas durante 72h, depois o meio foi removido, e as células foram fixadas em formaldeído 4% durante 20 min e coradas com violeta de cristal (0,5%) durante 10 min.

3.5 Ensaio de viabilidade celular em células BHK-21

Para estabelecer a concentração não tóxica das proteínas, uma suspensão de células BHK-21 foram plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma concentração de 1×10^4 células/poço e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO_2 por 16 horas. Diluições seriadas foram realizadas para cada composto no meio cultura e adicionadas às células em triplicata, sendo a Toxina 10 em concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 3,12 $\mu\text{g/mL}$ e 1,65 $\mu\text{g/mL}$, e as Toxinas 12, 15, 20 e PLA em concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Para os ensaios de viabilidade

celular em vírus completo as células foram incubadas por 16h, e para ensaios com células BHK-21 contendo o replicon subgenômico CHIKV-NCT, as células foram incubadas por 72h. PBS foi utilizado como controle não tratado. Em seguida o sobrenadante foi removido e às células adicionadas uma solução contendo *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide* (MTT) (Sigma-Aldrich) a 1mg/ml de meio de cultura, e incubadas a 37°C por 30 minutos. A solução MTT foi removida, substituída pelo mesmo volume de DMSO e submetida à leitura de comprimento de onda de 570nm e a porcentagem da viabilidade celular foi determinada pela média dos poços tratados x 100/ média dos poços controle.

3.6 Ensaio de Infectividade Viral

Para avaliar a atividade das proteínas isoladas de veneno de serpente no ciclo replicativo do CHIKV, foram plaqueadas células BHK-21 em microplacas de 96 poços a uma concentração de 1×10^4 células/poço. Após 16h, foram adicionadas as proteínas 10, 12, 15, 20 ou PLA nas maiores concentrações não citotóxicas na presença ou ausência do vírus (MOI de 0,01), diluídos em meio essencial mínimo de Glasgow (GMEM, GIBCO-BRLA, Grand Island, NY, USA). PBS foi utilizado como controle não tratado. Após 16h de incubação, o sobrenadante foi coletado e submetido a uma análise de luminescência em leitor de placa GloMax (PROMEGA). Os resultados obtidos foram normalizados pela média do PBS e multiplicados por 100 para obtenção das porcentagens.

3.7 Ensaio Antiviral em células BHK 21 CHIKV- NCT

Para avaliar a atividade das proteínas isoladas de veneno de serpente na replicação do CHIKV, células BHK-21-CHIKV-NCT foram cultivadas em microplacas de 96 poços a uma concentração de 1×10^4 células/poço. Após a aderência celular, foram adicionadas as proteínas nas concentrações não tóxicas determinadas, diluídas em meio essencial mínimo de Glasgow (GMEM, GIBCO-BRLA, Grand Island, NY, USA). PBS foi utilizado como controle não tratado. Após 72h de incubação, as taxas de inibição foram analisadas por detecção de fluorescência (ZsGreen) em microscópio de fluorescência e leitor de placa GloMax (PROMEGA) usando para excitação o comprimento de onda 493nm e para emissão 505nm. Os dados obtidos no leitor de placa foram inicialmente descontados o valor de interferência do meio (média do controle negativo com células sem fluorescência), e depois normalizados pela média do PBS e multiplicados por 100 para obtenção das porcentagens.

3.8 Análise estatística

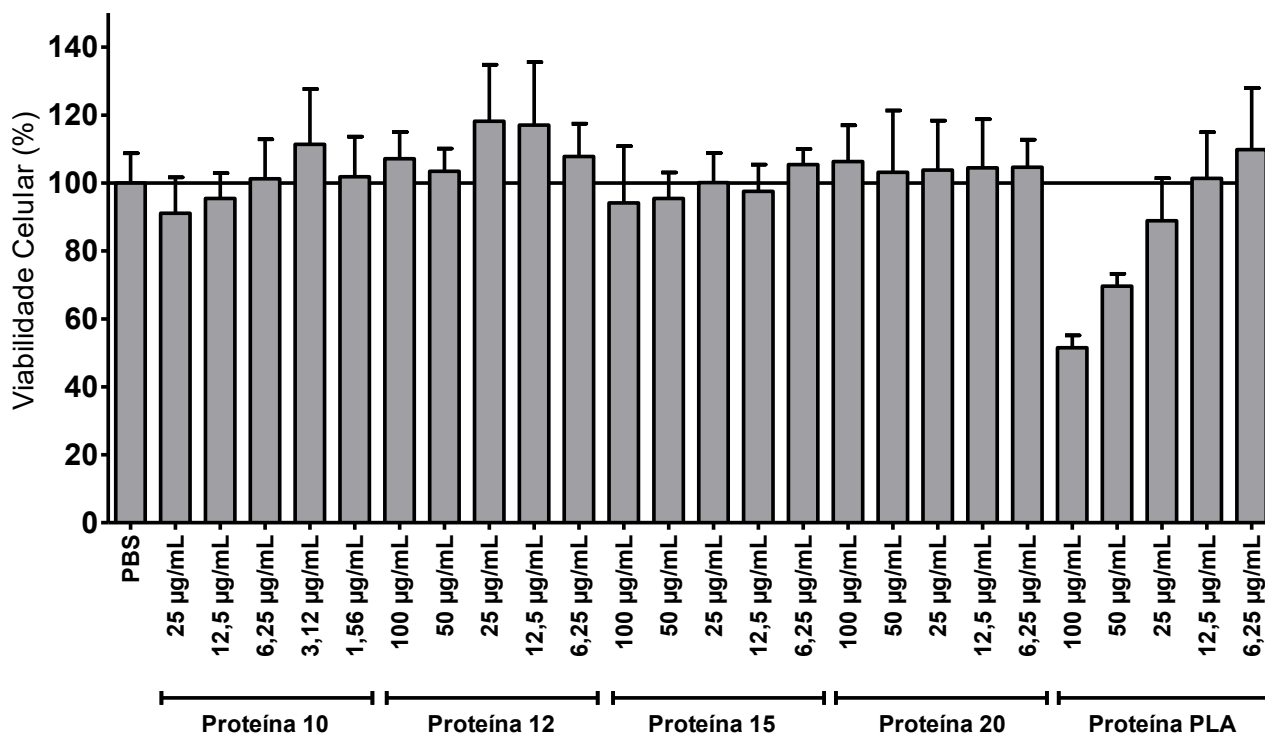
Todos os dados foram expressos por meio de média e desvio padrão. A análise estatística das diferenças foi determinada por meio de teste estatístico de análise de variância (one-way e two-way ANOVA) ou t-Student, onde valores de $p < 0.001$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Viabilidade celular

Ensaio de viabilidade celular foram realizados para avaliar o efeito de cada uma das 5 proteínas na viabilidade da linhagem celular BHK 21. A triagem inicial para citotoxicidade das proteínas demonstrou que a proteína 10 nas concentrações 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL e 1,56 µg/ml, apresentou viabilidade celular acima de 85%. As proteínas 12, 15 e 20 nas concentrações apresentaram a viabilidade celular acima de 90% nas concentrações testadas de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/ml. Já a proteína PLA apresentou citotoxicidade nas concentrações de 100 µg/ml e 50 µg/ml, com viabilidade 51% e 69%, respectivamente. Porém, nas concentrações de 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/ml, a viabilidade foi acima de 85% (Figura 15).

Figura 15: Viabilidade celular das proteínas isoladas de veneno de serpente em células BHK-21. Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados.



A viabilidade celular das 5 proteínas também foi testada em linhagem celular BHK 21-CHIKV-NCT. A proteína 10 apresentou-se viável em todas as concentrações

testadas (25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL e 1,56 µg/mL) com viabilidade maior de 90% na concentração mais alta testada. A proteína 12 foi viável nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL com a viabilidade igual ou maior 117% quando comparado ao controle. A proteína 15 foi tóxica na concentração de 100 µg, com viabilidade de 49%, porém nas concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/ml, a viabilidade foi igual ou maior a 85%. Já proteína 15 na concentração de 100 µg/mL teve uma viabilidade de 75% e, nas outras concentrações (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL) apresentou viabilidade em 100%. Enquanto a proteína PLA teve a viabilidade de 8%, 8% e 23% para as concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. Para as concentrações de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL a viabilidade foi de 69% e 77%, respectivamente. (Figura 16).

A partir dos ensaios realizados em ambas as linhagens celulares, foram selecionadas as maiores concentrações viáveis de cada toxina para fazer um ensaio antiviral (Tabela 2).

Figura 16: Viabilidade celular das proteínas isoladas de veneno de serpente em células BHK-21 CHIKV-NCT. Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados.

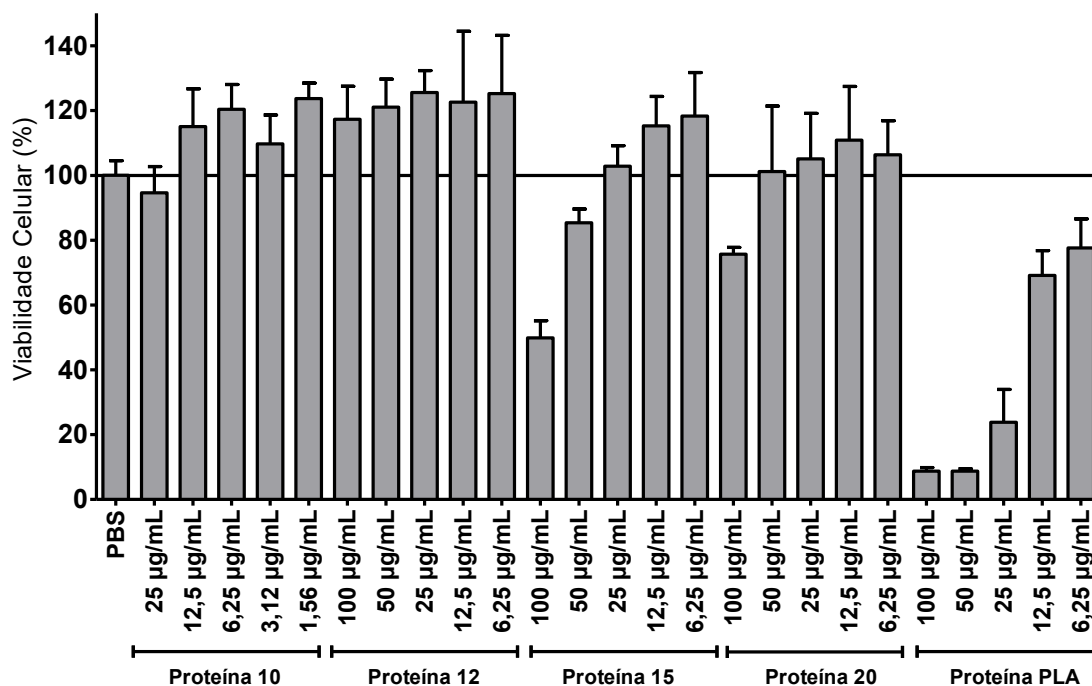


Tabela 2: Viabilidade celular dos compostos selecionados para ensaio de infecção e as concentrações determinadas como não-citotóxicas.

Proteína selecionada	Concentração viável em BHK-21 (µg/ml)	Viabilidade celular em BHK-21 (%)	Concentração viável em BHK-21 CHIKV-NCT (µg/ml)	Viabilidade celular em BHK-21 CHIKV-NCT (%)
Proteína 10	25	91,12	25	94,65
Proteína 12	100	107,17	100	117,30
Proteína 15	100	94,13	50	85,37
Proteína 20	100	106,32	50	101,20
Proteína PLA	25	88,88	6,25	77,61

4.2 Ensaios Antivirais

A infectividade viral foi avaliada infectando as células BHK-21 com o CHIKV na presença ou ausência dos compostos nas maiores concentrações não citotóxicas. As proteínas 10 a 25 µg/ml, 12 a 100 µg/ml e 15 a 100 µg/ml reduziram a taxa de infectividade para 58%, 68% e 72%, respectivamente (Figura 17). Contrariamente a proteína 20 a 100 µg/ml, que não apresentou inibição significativa da infectividade viral, a proteína PLA a 25 µg/ml reduziu a infectividade viral para 19% (Figura 17). Por apresentar a melhor taxa de inibição da infectividade viral, foram testadas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/ml, por meio de diluição seriada, para avaliar o efeito da proteína PLA em outras concentrações. Nas concentrações mais altas de 100 µg/mL e 50 µg/ml, a infectividade foi de 1% e 6%, respectivamente, entretanto, a viabilidade dos compostos foi de 51% e 69%, respectivamente (Figura 18). Já nas concentrações de 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/ml a infectividade foi de 19%, 21% e 65%, respectivamente, e apresentaram viabilidade acima de 88% (Figura 18).

Figura 17: Infectividade do CHIKV em células BHK-21 (cinza) e, viabilidade celular do tratamento com cada proteína na sua maior concentração viável (µg/ml) (branco). Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados. P <0,001 foi considerado significativo (***)

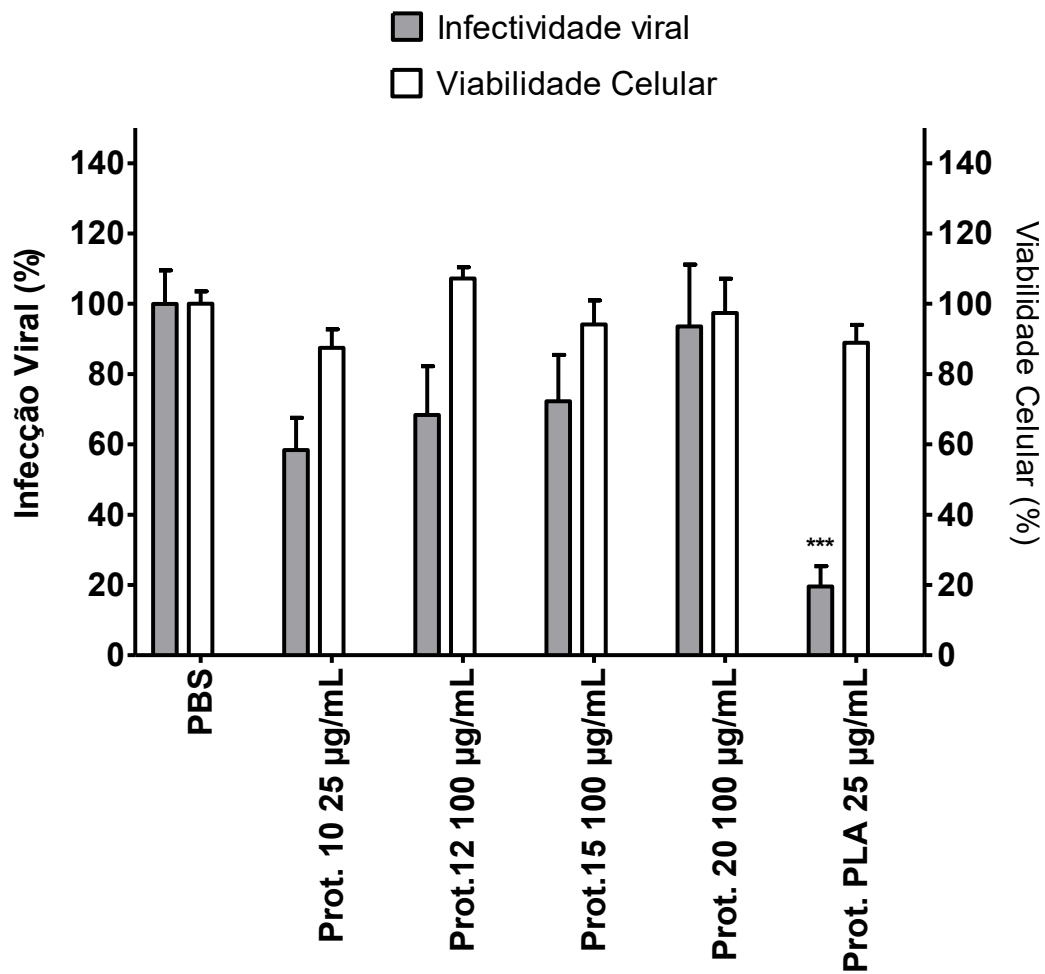
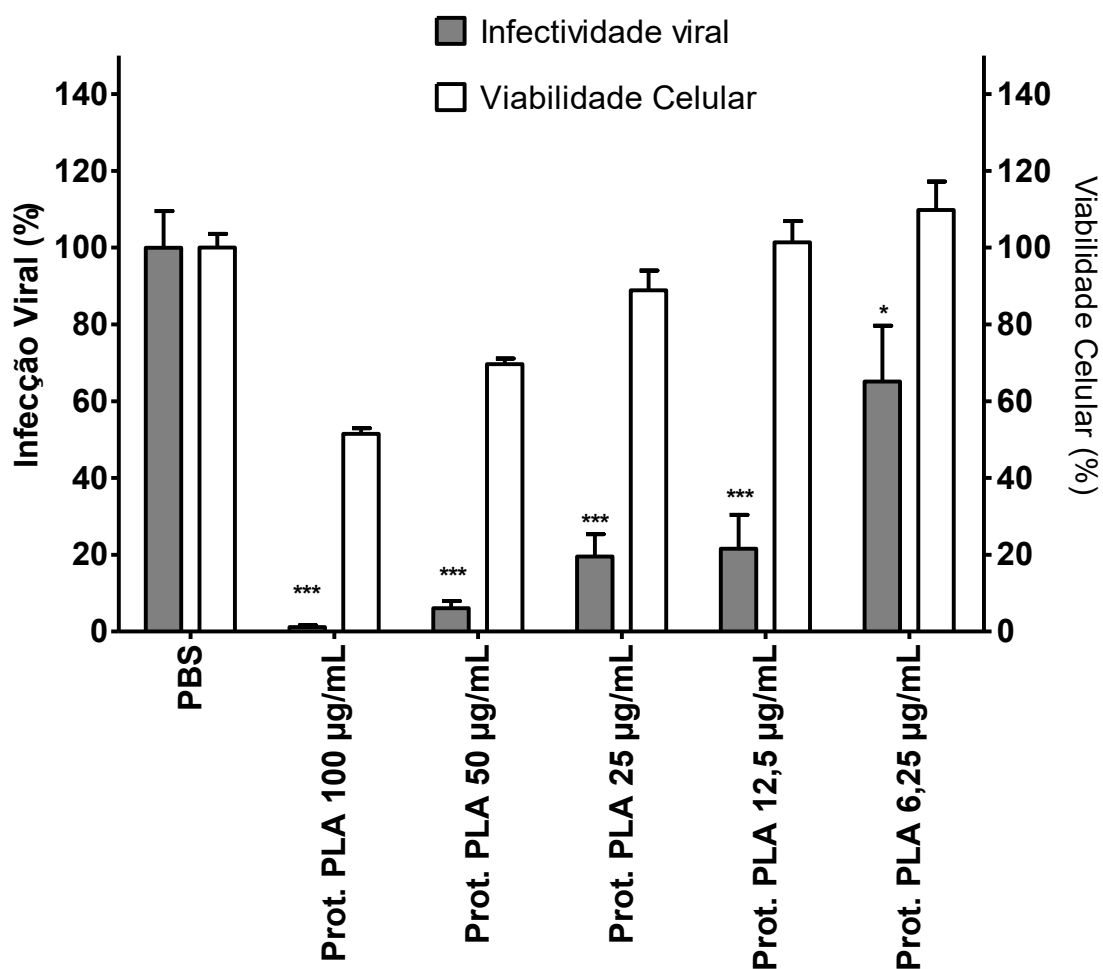
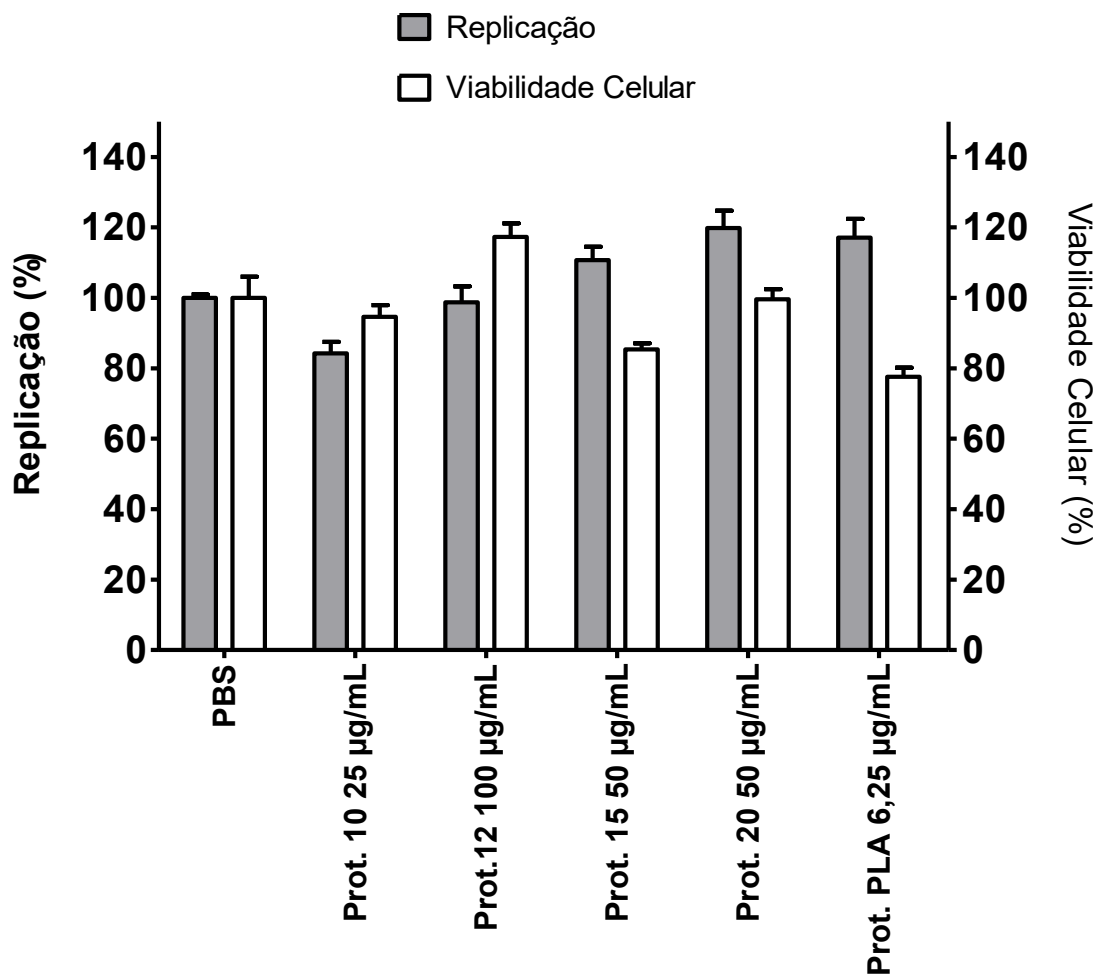


Figura 18: Infectividade do CHIKV em células BHK-21 (cinza) e, viabilidade celular do tratamento com a proteína PLA nas concentrações de 100-6,25 µg/ml. Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados. P <0,001 foi considerado significativo (***)).



Os efeitos antivirais do tratamento com as proteínas foram avaliados na etapa de replicação viral utilizando células BHK 21-CHIKV-NCT. O tratamento com as máximas concentrações não citotóxicas demonstrou que não houve redução estatisticamente significativa na replicação do CHIKV, sugerindo que estes compostos não atuam nessa etapa do ciclo replicativo viral (Figura 19).

Figura 19: Taxa de replicação do CHIKV em células BHK-21 CHIKV-NCT (cinza) e, viabilidade celular do tratamento com cada proteína na sua maior concentração viável ($\mu\text{g/ml}$) (branco). Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados. $P < 0,001$ foi considerado significativo (***)



5. DISCUSSÃO

A infecção pelo CHIKV é um problema de saúde global, e tem recebido pouca atenção pela comunidade médica quando comparado a outras arboviroses (MAHDY et al., 2018). A falta de um tratamento ou profilaxia específica para o combate ao vírus, e as técnicas atuais se baseando somente em tratamentos paliativos e controle dos vetores, dificulta o combate do vírus (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO BÁSICA, 2017). Por isso, são necessários estudos para o desenvolvimento de novos tratamentos contra essa infecção.

As proteínas isoladas de peçonha de serpente são uma mistura de proteínas, carboidratos, peptídeos, lipídeos, aminoácidos, entre outros com potencial para novas fontes terapêuticas e, por isso, têm sido utilizadas em testes *in vitro* contra vírus como HIV-1 e DENV-2 (CLEYSE et al., 2017).

As proteínas 10, 12, 15 e 20 apresentaram uma viabilidade celular para células BHK-21 acima de 90%, mesmo em concentrações elevadas. Esses dados corroboram com o estudo de Vera e colaboradores (2003), em que as proteínas de peçonhas não foram tóxicas na linhagem celular VERO E6, apresentando viabilidade de até 80% em concentrações de 100 µg/ml.

A fosfolipase PLA₂ é uma proteína que já demonstrou potente efeito antiviral contra os vírus da DENV-2 e YFV (MULLER et al., 2012), e contra o HCV (SHIMIZU et al., 2017). Nos estudos de Muller e colaboradores (2012), esse efeito na infectividade foi associado à ação direta no vírus ou a um efeito protetor na célula hospedeira. Em outro estudo do mesmo grupo, a fosfolipase PLA_{2CB} teve efeito na entrada do DENV-2 nas células, tendo um efeito virucida, desfazendo o envelope glicoproteico do vírus (MULLER et al., 2014). O CHIKV, por ser também um vírus envelopado (ROBERTS et al., 2017), levanta a possibilidade da atividade da proteína PLA_{2CB} estar relacionada também à entrada do vírus por interação com o envelope glicoproteico ou efeito protetor à célula, mas sem descartar a possibilidade de atividade em outras etapas do ciclo, como replicação, maturação e liberação. Shimizu e colaboradores demonstrou em seu estudo que a proteína PLA_{2CB} apresentou efeitos no ciclo replicativo do HCV na entrada e replicação viral, sendo esse também um vírus envelopado (SHIMIZU et al., 2017). Nossos estudos demonstraram que a PLA₂ possui um potente efeito antiviral contra o CHIKV. Entretanto, o ensaio de infectividade utilizado permitiu a identificação do efeito

da proteína no ciclo replicativo do vírus como um todo. Nossos resultados com células BHK-21 CHIKV-NCT demonstraram que a atividade dessa proteína não está relacionada à etapa replicação do vírus, visto que não houve inibição da mesma nas concentrações viáveis do composto. Portanto, ensaios adicionais serão necessários para identificar em qual ou quais etapas do ciclo replicativo do CHIKV a PLA_{2CB} possui atividade.

6. CONCLUSÃO

Foi demonstrado nesse estudo que as proteínas isoladas do veneno de serpentes brasileiras 10, 12, 15 e 20 testadas não apresentaram efeito significativo na infectividade do CHIKV.

Este estudo demonstrou que a proteína PLA₂ apresentou uma inibição significativa da infectividade do CHIKV *in vitro*. Esses dados demonstram pela primeira vez a atividade da proteína PLA no ciclo replicativo do CHIKV, e pode ser útil para o desenvolvimento de futuras terapias para o tratamento da infecção causada por esse vírus.

7. REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 121, p. 59–68, 2015.
- ABERLE, N.; CREWS, C. M. Exploring Biology with Small Organic Molecules. In: FU, H. (Ed.). **Chemical Genomics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. v. 432p. 10–25.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75–81, 2002.
- ALESSANDRA LO PRESTI et al. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925–932, 1 dez. 2014.
- ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR MOINHOS DE VENTO. **Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-Brasil): Resultados preliminares**. [s.l: s.n.].
- BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emergency Medicine Australasia**, v. 13, n. 1, p. 28–36, 1 mar. 2001.
- BENTES, A. L. A. et al. Structure of dihydrochalcones and related derivatives and their scavenging and antioxidant activity against oxygen and nitrogen radical species. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1749–1760, 2011.
- BORGHERINI, G. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401–1407, 1 jun. 2007.
- BRAATEN, K. P.; LAUFER, M. R. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. **Reviews in obstetrics & gynecology**, v. 1, n. 1, p. 2–10, 2008.
- BRANDÃO, G. C. et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 926–929, 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO BÁSICA. Chikungunya: Manejo Clínico. **Ministério da Saúde**, p. 77, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Febre de Chikungunya manejo clínico Febre de chikungunya: manejo clínico. 2015.
- BRONIARCZYK, J. et al. HPV-16 virions can remain infectious for 2 weeks on senescent cells but require cell cycle re-activation to allow virus entry. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- BUCK, C. B. et al. Maturation of papillomavirus capsids. **Journal of virology**, v. 79, n. 5, p. 2839–46, 1 mar. 2005.
- BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e107–e117, 2017.

- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.
- CAGNO, V. et al. The agmatine-containing poly(Amidoamine) polymer AGMA1 binds cell surface heparan sulfates and prevents attachment of mucosal human papillomaviruses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5250–5259, 2015.
- CARTER, J. R.; DING, Z.; ROSE, B. R. HPV infection and cervical disease: A review. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 51, n. 2, p. 103–108, 2011.
- CENTER FOR CANCER RESEARCH. **Protocol for harvesting pseudovirus producer cells**: Disponível em: <<https://home.ccr.cancer.gov/lco/pseudovirusproduction.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2018.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Countries and territories where chikungunya cases have been reported. **Cdc**, p. 1, 2018.
- CIESEK, S. et al. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. **Hepatology**, v. 54, n. 6, p. 1947–1955, dez. 2011.
- CLEYSE, É. et al. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. 2017.
- COHEN, S. N. et al. Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962–1964. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 6, p. 954–971, 1 nov. 1969.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. NIH Public Access. v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2014.
- CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889–899, set. 2013.
- CROW, J. M. HPV: The global burden. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. S2–S3, 2012.
- DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 10, n. 3, p. 397–412, set. 2011.
- DAS, T. et al. Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. **Progress in Neurobiology**, v. 91, n. 2, p. 121–129, jun. 2010.
- DE MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017.
- DE MELLO, T. F. P. et al. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental parasitology**, v. 136, p. 27–34, jan. 2014.
- DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

- DENG, J. et al. Mining the NCI antiviral compounds for HIV-1 integrase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3785–3792, 2006.
- DONG, L. R. et al. Study of the synthesis, antiviral bioactivity and interaction mechanisms of novel chalcone derivatives that contain the 1,1-dichloropropene moiety. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 7, p. 1566–1570, 1 jul. 2017.
- DORNAS, W.C, OLIVEIRA, T.T, RODRIGUES DAS DORES, R.G, SANTOS, A.F, NAGEM, T. . Flavonóides : Potencial Terapêutico no Estresse Oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2008.
- DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1446, 27 mar. 2012.
- FABIAN VILLALTA-ROMERO. Discovery of small molecule inhibitors for the snake venom metalloprotease BaP1 using in silico and in vitro tests. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 9, p. 2018–2022, 1 maio 2017.
- FIGUEIRÊDO, C. Abordagem terapêutica para o Papilomavírus humano (HPV). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 4–17, 2013.
- FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 1, p. 116–134, 2007.
- GANESAN, A. Natural products as a hunting ground for combinatorial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 584–590, 2004.
- GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 3, p. 306–317, 1 jun. 2008.
- GAY, N. et al. Seroprevalence of asian lineage chikungunya virus infection on saint martin Island, 7 months after the 2013 emergence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 393–396, 2016.
- GONZÁLEZ ALBADELAJO, J. et al. Curcumin and curcuminoids : chemistry , structural studies and biological properties. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 81, n. 4, p. 278–310, 2015.
- GOULD, E. A. et al. Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 111–124, ago. 2010.
- GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of Aedes albopictus. **Medical and veterinary entomology**, v. 18, n. 3, p. 215–27, set. 2004.
- HALSTEAD, S. B. Reappearance of chikungunya, formerly called Dengue, in the Americas. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 557–561, 2015.
- HARVEY, A. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, out. 2008.
- JHA, A. et al. Curcumin-inspired cytotoxic 3,5-bis(arylmethylene)-1-(N-(ortho-substituted aryl)maleamoyl)-4-piperidones: A novel group of topoisomerase II alpha inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 19, p. 6404–17, 1 out. 2015.

JOHANSSON, C.; SCHWARTZ, S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 239–51, 2013.

LABORATORY OF CELLULAR ONCOLOGY, N. (**Ripcord**) **Alternative Protocol: Removal of Capsids Containing Cellular DNA Fragments**, 2015. Disponível em: <<https://home.ccr.cancer.gov/lco/ripcord.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2018

LALL, N.; HUSSEIN, A. A.; MEYER, J. J. M. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents. **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 230–232, abr. 2006.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279–289, jun. 2007.

LEE, V. J. et al. Simple Clinical and Laboratory Predictors of Chikungunya versus Dengue Infections in Adults. 2012.

LI, B. Q. et al. Flavonoid Baicalin Inhibits HIV-1 Infection at the Level of Viral Entry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 2, p. 534–538, set. 2000.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–11, 2017.

LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, p. 165–174, 2015.

LUMSDEN, W. H. . An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1 jan. 1955.

MACHADO, HUSSEN; NAGEM, TANUS; PETERS, VERA; FONSECA, CRISTIANE; OLIVEIRA, T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33–39, 2008.

MAHDY, A. AL et al. Chikungunya virus outbreak-a threat to global public health including Bangladesh. **Bangladesh Journal of Medical Science**, v. 17, n. 2, p. 183, 23 mar. 2018.

MAHER, D. M. et al. Curcumin suppresses human papillomavirus oncoproteins, restores p53, rb, and ptpn13 proteins and inhibits benzo[a]pyrene-induced upregulation of HPV E7. **Molecular Carcinogenesis**, v. 50, n. 1, p. 47–57, 1 jan. 2011.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 380–385, jun. 2006.

MAVALE, M. et al. Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1242–1244, 2010.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F. Biology of human papillomaviruses. p. 15–33, 2001.

MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. No Title No Title. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, 2015.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estudo apresenta dados nacionais de Prevalência da Infecção pelo HPV**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42003-estudo-apresenta-dados-nacionais-de-prevalencia-da-infeccao-pelo-hpv>>.
- MISHRA, A.; DAS, B. C. Curcumin as an anti-human papillomavirus and anti-cancer compound. **Future Oncology**, v. 11, p. 2487+, 2015.
- MOODY, C. A; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.
- MULLER, V. D. et al. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–10, 2014.
- MULLER, V. D. M. et al. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507–515, 15 mar. 2012.
- NAKAMURA, Y. et al. Dihydrochalcones: Evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3309–3312, 2003.
- NGOAGOUNI, C. et al. Potential of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* populations in the Central African Republic to transmit enzootic chikungunya virus strains. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 164, 2017.
- NIELSEN, S. F. et al. Antibacterial chalcones—bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 3047–3054, jun. 2004.
- NJENGA, M. K. et al. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 11, p. 2754–2760, 2008.
- NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125–137, fev. 2007.
- OLIVEIRA, R. DE M. A. B. et al. Maternal and infant death after probable vertical transmission of chikungunya virus in Brazil – case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 333, 16 dez. 2018.
- OLIVON, F. et al. Bioactive Natural Products Prioritization Using Massive Multi-informational Molecular Networks. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 10, p. 2644–2651, 20 out. 2017.
- OMS. **Chikungunya**. Disponível em: <<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>. Acesso em: 23 out. 2018.
- ONDETTI, M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. **Biochemistry**, v. 10, n. 22, p. 4033–4039, out. 1971.
- ONU-BR. **No Brasil, 54,6% das pessoas com idade entre 16 a 25 anos têm HPV | ONU Brasil**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/no-brasil-546-das-pessoas-com-idade-entre-16-a-25-anos-tem-hpv/>>. Acesso em: 19 fev. 2018.
- PAGÈS, F. et al. Correction: *Aedes albopictus* Mosquito: The Main Vector of the 2007 Chikungunya Outbreak in Gabon. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 27 maio 2009.

- PAULRAJ, F. et al. **The curcumin analogue 1,5-bis(2-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one induces apoptosis and downregulates E6 and E7 oncogene expression in HPV16 and HPV18-infected cervical cancer cells.** [s.l: s.n.]. v. 20
- PIALOUX G, GAÜZÈRE BA, JAURÉGUIBERRY S, S. M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 319–327, 1 maio 2007.
- POWERS, A. M. et al. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471–479, 2000.
- PRASAD, S.; TYAGI, A. K. Curcumin and its analogues: a potential natural compound against HIV infection and AIDS. **Food & function**, v. 6, n. 11, p. 3412–9, nov. 2015.
- QIN, Y. et al. Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 in vitro. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 4, p. 284–294, 2014.
- RASHAD, A. A.; MAHALINGAM, S.; KELLER, P. A. Chikungunya Virus : Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. 2013.
- RAVI, V. Re-emergence of chikungunya virus in India. **Indian journal of medical microbiology**, v. 24, n. 2, p. 83–4, abr. 2006.
- REMENYI, R. et al. Persistent Replication of a Chikungunya Virus Replicon in Human Cells Is Associated with Presence of Stable Cytoplasmic Granules Containing Nonstructural Protein 3. **Journal of Virology**, v. 92, n. 16, p. JVI.00477-18, 6 jun. 2018.
- ROBERTS, G. C. et al. Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14641, 7 dez. 2017.
- ROSS, B. Y. R. W. the Newala Epidemic and Relationship To the Epidemic. p. 177–191, 1955.
- ROUGERON, V. et al. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 144–152, mar. 2015.
- RUPAMONI THAKUR; ASHIS K. MUKHERJEEA. Pathophysiological significance and therapeutic applications of snake venom protease inhibitors. **Toxicon**, v. 131, p. 37–47, 1 jun. 2017.
- SAMBRI, V. et al. The 2007 epidemic outbreak of Chikungunya virus infection in the Romagna region of Italy: A new perspective for the possible diffusion of tropical diseases in temperate areas? **New Microbiologica**, v. 31, n. 3, p. 303–304, 2008.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico 31. v. 49, n. Tabela 1, p. 1–14, 2018.
- SENTHILVEL, P. et al. Flavonoid from *Carica papaya* inhibits NS2B-NS3 protease and prevents Dengue 2 viral assembly. **Bioinformatics**, v. 9, n. 18, p. 889–895, 11 nov. 2013.
- SHIMIZU, J. F. et al. Multiple effects of toxins isolated from *Crotalus durissus terrificus* on the hepatitis C virus life cycle. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187857, 15 nov. 2017.

- SILVA, N. M. DA et al. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 3, p. e2017127, 2018.
- SILVA, L. A. et al. Chikungunya virus : epidemiology , replication , disease mechanisms , and prospective intervention strategies Find the latest version : Chikungunya virus : epidemiology , replication , disease mechanisms , and prospective intervention strategies. v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 1006–1015, mar. 2006.
- SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, out. 2009.
- SPRIGGS, C. C.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus and the DNA damage response: Exploiting host repair pathways for viral replication. **Viruses**, v. 9, n. 8, 2017.
- STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, v. 117, n. 2 SUPPL., p. S5–S10, 2010.
- STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, n. 6, p. 379–386, dez. 1999.
- TEIXEIRA, R. R. et al. Natural products as source of potential dengue antivirals. **Molecules**, v. 19, p. 8151–8176, 2014.
- THON-HON, V. G. et al. Deciphering the differential response of two human fibroblast cell lines following Chikungunya virus infection. p. 1–10, 2012.
- UNIVERSITY OF NEBRASKA-LINCOLN, A. F. **Human papillomavirus (inside)**. Disponível em: <<http://worldofviruses.unl.edu/human-papillomavirus-inside/>>. Acesso em: 23 out. 2018.
- VARGHESE, F. S. et al. The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. **Journal of virology**, v. 90, n. 21, p. 9743–9757, 1 nov. 2016.
- VERA L. PETRICEVICH; RONALDO Z. MENDONÇA. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p. 143–153, 1 ago. 2003.
- VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- VOLK, S. M. et al. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, 2010.
- W.H.O. **WHO | Chikungunya - World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>>. Acesso em: 26 set. 2017.
- WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, ago. 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer**. Disponível em: <[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)>. Acesso em: 29 nov. 2018.

YANG, M. et al. Curcumin Shows Antiviral Properties against Norovirus. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1401, 20 out. 2016.

ZARDO, G. P. et al. Vacina como agente de imunização contra o HPV. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 9, p. 3799–3808, 2014.

ZHU, Z. et al. Heme oxygenase-1 suppresses hepatitis C virus replication and increases resistance of hepatocytes to oxidant injury. **Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 1430–1439, 1 nov. 2008.