



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICBIM



JHENNYFER RODRIGUES DA SILVA AGUIAR

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ISOFLAVONÓIDES
ISOLADOS DO EXTRATO DA PRÓPOLIS VERMELHA NA REPLICAÇÃO DO
VÍRUS CHIKUNGUNYA *IN VITRO*”**

UBERLÂNDIA - MG

2020

JHENNYFER RODRIGUES DA SILVA AGUIAR

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ISOFLAVONÓIDES
ISOLADOS DO EXTRATO DA PRÓPOLIS VERMELHA NA REPLICAÇÃO DO
VÍRUS CHIKUNGUNYA *IN VITRO*”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina na Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador(a): Prof. Dra. Ana Carolina Gomes
Jardim

Co-orientador(a): Ms. Daniel Oliveira Silva
Martins

UBERLÂNDIA - MG
2020

JHENNYFER RODRIGUES DA SILVA AGUIAR

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ISOFLAVONÓIDES
ISOLADOS DO EXTRATO DA PRÓPOLIS VERMELHA NA REPLICAÇÃO DO
VÍRUS CHIKUNGUNYA *IN VITRO*”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina na Universidade
Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 07 de outubro de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof. Dra. Carolina Colombelli Pacca Mazaro
Faculdade Faceres

Prof. Dr. Fernando Rodrigues Goulart Bergamini
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, pois seria impossível realizar esse sonho se não sentisse sua presença em minha vida todos os dias. É Ele quem me impulsiona a ser uma pessoa melhor a cada amanhecer.

Gostaria de agradecer à minha família, minha mãe Raquel e meu pai Silvio, que sempre me incentivaram a estudar e conquistar o mundo, que em momento algum me deixaram recuar e sempre me ajudaram em tudo, mesmo em meio a tantas dificuldades. Ao meu irmão Matheus, que só veio ao mundo para testar minha paciência, mas eu o amo, e ao meu namorado Arthur, que nunca me deixou desistir. Foi ele que nos dias em que me senti triste ou desanimada, foi capaz de me fazer enxergar coisas melhores. Ele sonha comigo, e me ajuda a realizar esses sonhos!

Quero agradecer também a Prof. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim, minha orientadora, pois ela é uma mulher inspiradora: Muito obrigada por me receber no Laboratório de Virologia e deixar com que eu aprendesse com essa equipe maravilhosa! E por falar em equipe, quero também agradecer a todos do Laboratório de Virologia, em especial ao Daniel, meu coorientador e ao Igor, que sempre se mostraram dispostos e me auxiliaram em tudo!

Agradeço aos amigos que fiz na universidade, que tornaram meus dias alegres e descontraídos: aprendi muito com vocês também!

A todos que com amor transmitiram seu conhecimento e me fizeram enxergar toda a beleza da Biomedicina!

Aos meus avós, tios e primos que me apoiaram e vibraram comigo a cada conquista, que fizeram da minha felicidade, a felicidade deles!

Sem vocês em minha vida, essa etapa não teria sido tão emocionante e maravilhosa.

Meu muito obrigada a todos!

RESUMO

As arboviroses são doenças virais transmitidas por artrópodes hematófagos como mosquitos e carrapatos. O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* spp., responsável por surtos recentes no Brasil, gerando elevado número de casos. A infecção pelo CHIKV apresenta sintomas característicos de arboviroses como febre, dores de cabeça e musculares, além de artralgia que pode se tornar crônica em alguns casos. Compostos naturais apresentam atividades biológicas importantes como, por exemplo, os isoflavonóides vestitol, neovestitol e medicarpina isolados da própolis vermelha, que já demonstraram, dentre outras, ação antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral. No entanto, até o momento e de nosso conhecimento, não existem estudos envolvendo a atividade antiviral destes compostos. Desta forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antiviral do vestitol, neovestitol e medicarpina na replicação do CHIKV, por meio do estabelecimento de uma linhagem celular estável (BHK-CHIKV-NCT) de células de rim de hamster bebê (BHK-21), que expressassem continuamente o *replicon* subgenômico CHIKV-NCT, uma construção que possui regiões que codificam proteínas não estruturais (nsP) do vírus, e genes “reporters”, que conferem emissão de luminescência, fluorescência e resistência ao antibiótico puromicina. Ensaio de viabilidade celular (MTT) foram realizados na presença ou ausência dos compostos para determinar a máxima concentração não tóxica de cada composto, que foi utilizado nos ensaios antivirais. Os resultados demonstraram redução estatisticamente significativa na replicação do CHIKV em 71% para o composto vestitol e de 51% para o composto medicarpina, demonstrando o potencial antiviral dos compostos isolados da própolis vermelha no combate à febre chikungunya.

ABSTRACT

Arboviruses are viral diseases transmitted by hematophagous arthropods such as mosquitoes and ticks. The Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes* spp., responsible for recent outbreaks in Brazil, producing a high number of cases. The CHIKV infection presents characteristic symptoms of arboviruses, such as fever, headaches and muscles aches, in addition to arthralgia which, in some cases, lead to a chronic character. Natural compounds possess important biological activities as, for example, the isoflavonoids vestitol, neovestitol and medicarpine, isolated from red propolis, which have already demonstrated antibacterial, anti-inflammatory, anticancer action, among others. However, up to date and to our knowledge, there are no studies encompassing the antiviral activity for these compounds. Thus, this study aimed to evaluate the antiviral activity of vestitol, neovestitol and medicarpine on the CHIKV replication employing a stable cell line (BHK-CHIKV-NCT) from baby hamster kidney cells (BHK-21), which continuously expressed the subgenomic *replicon* CHIKV-NCT, a construct that possesses regions that encode non-structural proteins (nsP) of the virus as well as gene "reporters", which confer luminescence, fluorescence and resistance to the antibiotic puromycin. Cell viability assays (MTT) were performed in the presence or absence of the compounds to determine the maximum non-cytotoxic concentrations of each compound, used in the antiviral assays. The results showed a statistically significant reduction in the replication of CHIKV in 71% for the vestitol and 51% for the medicarpine, showing the potential antiviral activity of these compounds isolated from red propolis to combat the chikungunya fever.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA DO VÍRION E GENOMA VIRAL	5
FIGURA 2- CICLO REPLICATIVO DO CHIKV.....	6
FIGURA 3- DISTRIBUIÇÃO DAS CEPAS DO CHIKV E MOSQUITOS DO GÊNERO AEDES SPP.	8
FIGURA 4- SINTOMAS CAUSADOS PELA INFECÇÃO PELO CHIKV	9
FIGURA 5- DISSEMINAÇÃO DO CHIKV PÓS INFECÇÃO.....	10
FIGURA 6- ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS AVALIADOS NESSE ESTUDO.	13
FIGURA 7- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO REPLICON SUBGENÔMICO CHIKV-NCT.....	14
FIGURA 8- VISUALIZAÇÃO EM GEL DE AGAROSE 1% E BROMETO DE ETÍDEO	17
FIGURA 9- FLUORESCÊNCIA EMITIDA POR CÉLULAS BHK-CHIKV-NCT.....	18
FIGURA 10- VIABILIDADE EM CÉLULAS BHK-CHIKV-NCT TRATADAS COM OS COMPOSTOS VESTITOL, NEOVESTITOL E MEDICARPINA.....	19
FIGURA 11- ATIVIDADE ANTI-CHIKV DOS ISOFLAVONÓIDES VESTITOL, NEOVESTITOL E MEDICARPINA.	20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- QUANTIFICAÇÃO EM ESPECTOFOTÔMETRO DO PLASMÍDEO CHIKV-NCT E DNA LINEAR.	17
TABELA 2- VIABILIDADE CELULAR, EXPRESSA EM PORCENTAGEM, NA PRESENÇA DE CADA COMPOSTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	19
TABELA 3- LUMINESCÊNCIA EM CÉLULAS BHK-CHIKV-NCT TRATADAS COM OS COMPOSTOS A 10 µM/ML.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

AUL – Estirpe asiática

BHK-21 – Células de rim de hamster bebê

C – Proteína do capsídeo

CHIKV – Vírus Chikungunya

CO² - Dióxido de carbono

DENV- Vírus da Dengue

DMEM – Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco's

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ECISA – Estirpe leste-centro-sul Africana

EGFP – Proteína de fluorescência verde

E1 – Proteína do envelope 1

E2 – Proteína do envelope 2

IOL – Estirpe do Oceano Indico

KB – Kilo bases

LB – Meio Luria Bertani

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide

NCT – Não citotóxico

NOT 1 – Enzima de restrição

NRT – Regiões não traduzidas

NSP – Proteínas não estruturais

ORF – Fase de leitura aberta

PAC - Puromicina N-acetiltransferase

PBS – Tampão Fosfato salino

RLUC – Renilla luciferase

RNA – Ácido ribonucleico

TIM-1 – Receptor *T-cell immunoglobulin and mucin domain protein 1*

WA – Estirpe do Oeste Africano

ZIKV – Vírus da Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Arboviroses	4
1.2. O CHIKV e a Febre Chikungunya.....	4
1.3. Tratamento atual da Febre Chikungunya	10
1.4. Propriedades biológicas e potencial antiviral da Própolis vermelha	11
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVO GERAL.....	12
3.1. Objetivos específicos:.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS:	13
4.1. Compostos	13
4.2. Cultura de Células	13
4.3. <i>Replicon</i> subgenômico de CHIKV	14
4.4. Preparação do RNA do <i>replicon</i> CHIKV para transfecção das células.....	14
4.5. Estabelecimento da linhagem celular estável BHK-CHIKV-NCT	15
4.6. Ensaio de viabilidade em células BHK-CHIKV-NCT.....	15
4.7. Ensaio antiviral em <i>replicon</i> subgenômico	16
4.8. Estatística	16
5. RESULTADOS:	16
5.1. Estabelecimento da linhagem estável de BHK-CHIKV- NCT	16
5.2. Ensaio de viabilidade em células BHK-CHIKV-NCT.....	18
5.3. Ensaio de luminescência em células BHK-CHIKV-NCT	19
6. DISCUSSÃO:	21
7. CONCLUSÃO:.....	22
8. REFERÊNCIAS:	22

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arboviroses

Arboviroses são doenças causadas por vírus e transmitidos por artrópodes hematófagos, representando atualmente um grande problema de saúde mundial que afeta, principalmente, regiões tropicais (NERIS et al., 2018; WU et al., 2019). Estas doenças são consideradas enzoóticas quando circulam entre alguns animais silvestres vertebrados e invertebrados. Porém, devido ao aumento de ações antropogênicas e capacidade de adaptação desses vírus, as arboviroses vem sendo notificadas em vários países, sendo veiculadas por diferentes vetores como mosquitos, moscas hematófagas e carrapatos (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; WEAVER; REISEN, 2010).

No Brasil, os principais arbovírus circulantes incluem o vírus da Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) e o vírus da Febre amarela (YFV), responsáveis por diversos surtos nas últimas décadas. Estes vírus circulam de maneira concomitante, tendo como principal vetor os mosquitos do gênero *Aedes* spp. (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; NERIS et al., 2018). Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde demonstraram que entre a primeira semana de 2019 até o momento atual (semana epidemiológica 32 de 2020) foram registrados 2.692.164 casos prováveis de infecção pelos arbovírus citados acima, com 1.375 óbitos confirmados (BRASIL.; SAÚDE; SAÚDE, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

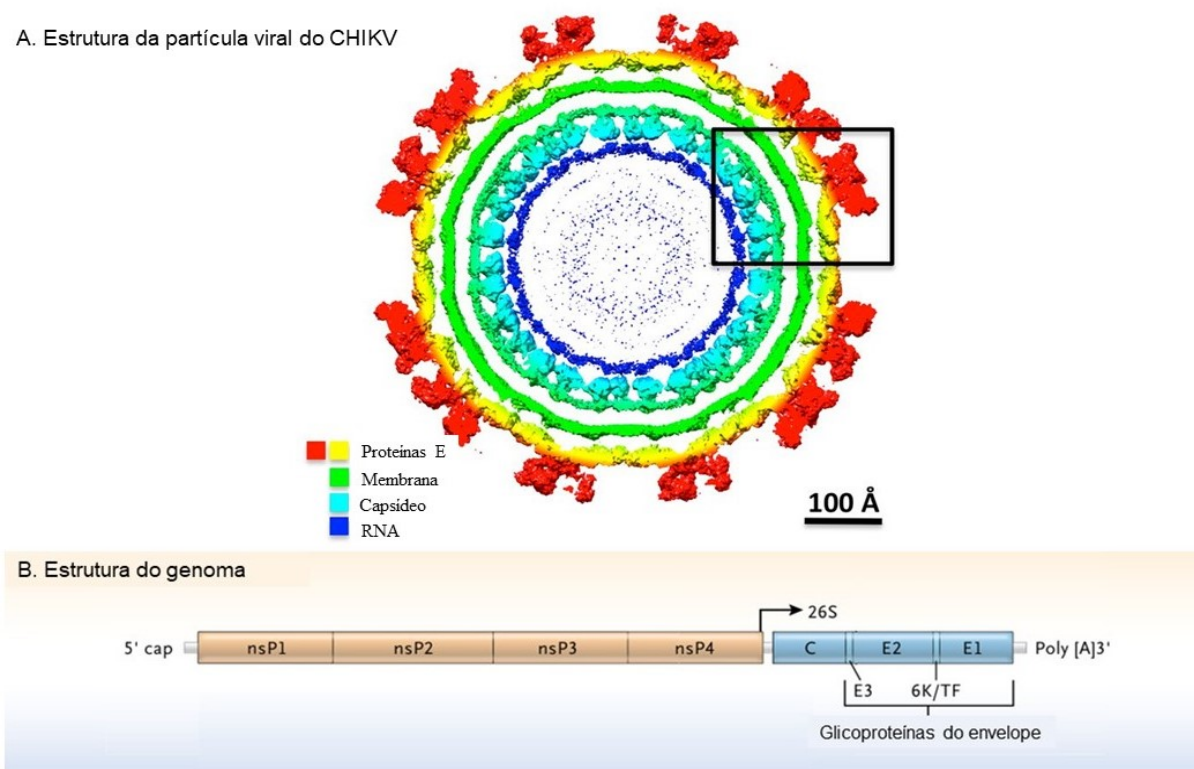
1.2. O CHIKV e a Febre Chikungunya

O CHIKV foi detectado pela primeira vez em 1952 na Tanzânia, África (ROSS, 1956). A palavra chikungunya vem do dialeto africano Makonde que significa “aqueles que se dobram”, em referência ao andar curvado dos indivíduos infectados devido à intensa artralgia (dores nas articulações), o principal sintoma clínico da febre Chikungunya (MEJÍA; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018).

CHIKV é um vírus envelopado, esférico, com tamanho entre 60 e 70 nm, possuindo um capsídeo icosaédrico, pertencente ao gênero Alphavirus e à família *Togaviridae* (Figura 1A). Como é característico desse gênero de vírus, o CHIKV possui um genoma de RNA cadeia simples, polaridade positiva e com aproximadamente 12 kb, com duas regiões de leitura aberta (*Open Reading frames*, ORFs). A primeira ORF

codifica as quatro proteínas não estruturais (nsPs) do vírus (nsPs 1 - 4), e a segunda codifica as proteínas estruturais do capsídeo, glicoproteínas do envelope (E1, E2 e E3) e a proteína 6k (Figura 1B) (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; FROLOV; FROLOVA, 2018; LIMA-CAMARA, 2016; MADARIAGA; TICONA; RESURRECCION, 2016). O genoma do CHIKV também possui três regiões não traduzidas (*non-translated regions*, NTRs). A 5' NTR possui 76 nucleotídeos e a 3' NTR, 526 nucleotídeos. A terceira NTR consiste em 68 nucleotídeos entre as 2 ORFs, com uma sequência promotora que possibilita a síntese do RNA subgenômico 26S, que codifica todas as proteínas estruturais (Figura 1B) (WONG; CHU, 2018).

Figura 1- Estrutura do vírion e genoma viral

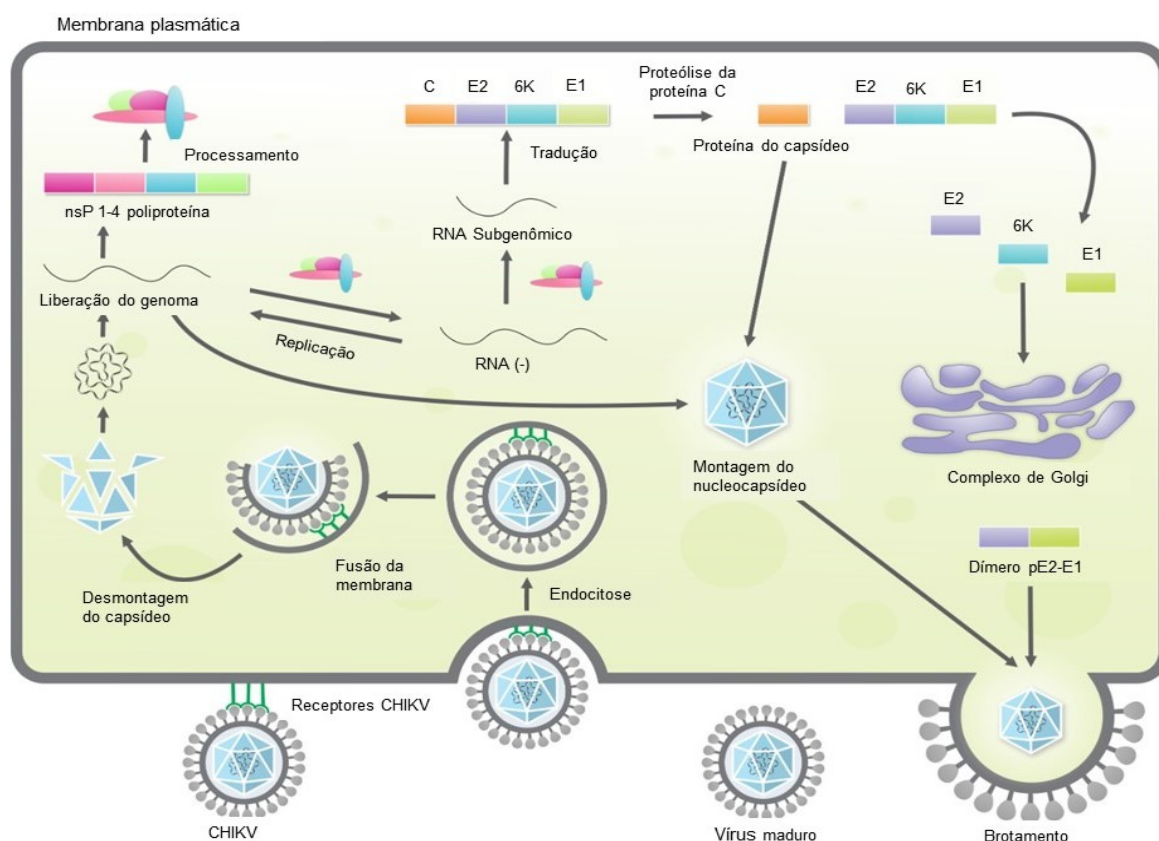


A. Representação da estrutura do vírion do CHIKV Adaptado de (YAP et al., 2017); B. Representação esquemática do genoma do CHIKV demonstrando as ORFs e as NTRs. Adaptado de (WEAVER; LECUIT, 2015)

O ciclo replicativo do CHIKV se inicia pela adsorção da glicoproteína E2 a receptores de superfície celular de clatrina, proibitina, TIM-1 ou glicosaminoglicanos na célula hospedeira humana, fazendo com que o vírus seja endocitado (HOORNWEG et al., 2016). Após a internalização, o endossomo, mediado pela

glicoproteína E1 se funde com o envelope do vírus devido a mudanças no pH endossomal, liberando o RNA viral para o citoplasma da célula hospedeira (Figura 2) (WEAVER; LECUIT, 2015; WONG; CHU, 2018). O RNA viral é traduzido em uma poliproteína nsP1-4, posteriormente clivada em nsP1-3 e nsP4, formando um complexo de replicação ativo, permitindo a síntese da fita de RNA de polaridade negativa. A clivagem desse último complexo de proteínas em nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 induz a síntese do RNA viral completo, traduzindo também as proteínas estruturais para completa montagem das novas partículas virais. Em seguida, o vírus é liberado por brotamento, levando uma parte da membrana da célula hospedeira (Figura 2) (FROLOV; FROLOVA, 2018; MÜLLER et al., 2019; WONG; CHU, 2018).

Figura 2- Ciclo replicativo do CHIKV



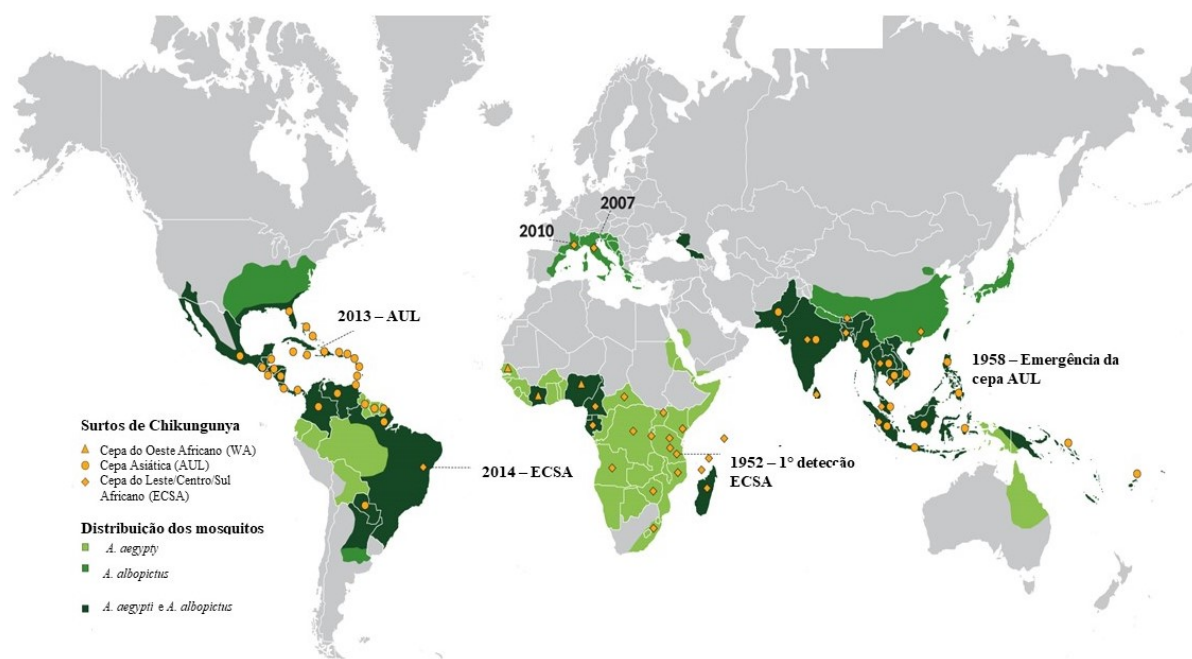
Ciclo replicativo viral. Adaptado de (MARTINS et al., 2020);

Estudos filogenéticos demonstraram que existem quatro linhagens de CHIKV com duas cepas distintas foram originadas a partir de uma linhagem comum, 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 na Ásia cerca de 150 anos atrás, causado pela

cepa ECSA, possivelmente propiciou a sua diferenciação na Linhagem Urbana Asiática (AUL) (Figura 3) (BURT et al., 2017; VOLK et al., 2010). Adicionalmente, a inserção de ECSA nas regiões do Oceano Índico deu origem a linhagem do Oceano Índico (IOL). Entretanto, estima-se que essa linhagem tenha se extinguido (BURT et al., 2017; VOLK et al., 2010).

Devido a uma mutação que altera um resíduo de valina na E1, o CHIKV se tornou capaz de infectar mosquitos da espécie *Aedes albopictus* (SUDEEP et al., 2019). Consequentemente, casos de infecção por CHIKV passaram a ser reportados em regiões de clima subtropical e temperado (WONG; CHU, 2018). Em 2013, houve a primeira detecção da transmissão autóctone do CHIKV nas américas, na Ilha de San Martin no Caribe. Em 2014, foram relatados os primeiros casos de Febre Chikungunya no Brasil, causados pelas cepas AUL e ECSA, notificados nos estados do Amapá e Bahia (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015), com posterior disseminação para os demais estados do território brasileiro (Figura 3) (SILVA et al., 2018a). Desde então, essas cepas foram responsáveis por mais de 650 mil casos de febre Chikungunya entre os anos de 2014 e 2019 (SILVA et al., 2018a). No ano de 2020, foram registrados até a semana epidemiológica 36, 69.702 casos prováveis de febre Chikungunya, com uma incidência de 33,2 casos por 100 mil habitantes, e 14 óbitos confirmados (SAÚDE, BRASIL. MINISTÉRIO DA. SAÚDE, 2020).

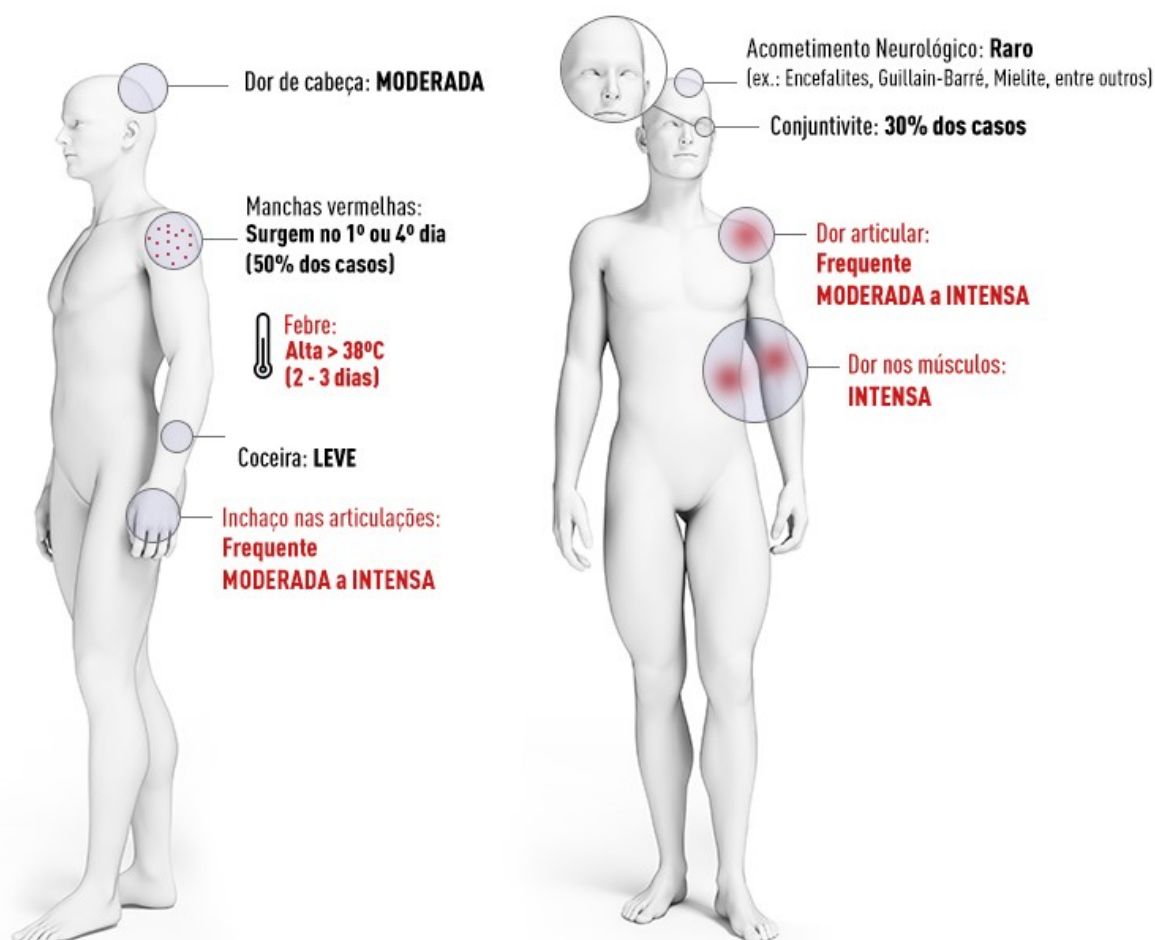
Figura 3- Distribuição das cepas do CHIKV e mosquitos do gênero *Aedes* spp.



Retirado e adaptado de: <https://www.sciencenewsforstudents.org/article/chikungunya-wings-its-way-north-mosquitoes> Acesso em 01/10/2020.

A Febre Chikungunya é o nome da doença provocada pelo CHIKV. Após infecção, o período de incubação varia entre 2 e 12 dias, e os infectados podem manifestar sintomas clínicos característicos das arboviroses, como febre alta, dores de cabeça, conjuntivite, náuseas, vômitos, mialgia, artralgia, erupções cutâneas e, em alguns casos, manifestações neurológicas (BRIZZI, 2017; WONG; CHU, 2018) (Figura 4). O sintoma mais marcante da infecção pelo CHIKV é o distúrbio articular (Figura 4), que auxilia o diagnóstico clínico da Febre Chikungunya (SILVA et al., 2018b).

Figura 4- Sintomas causados pela infecção pelo CHIKV

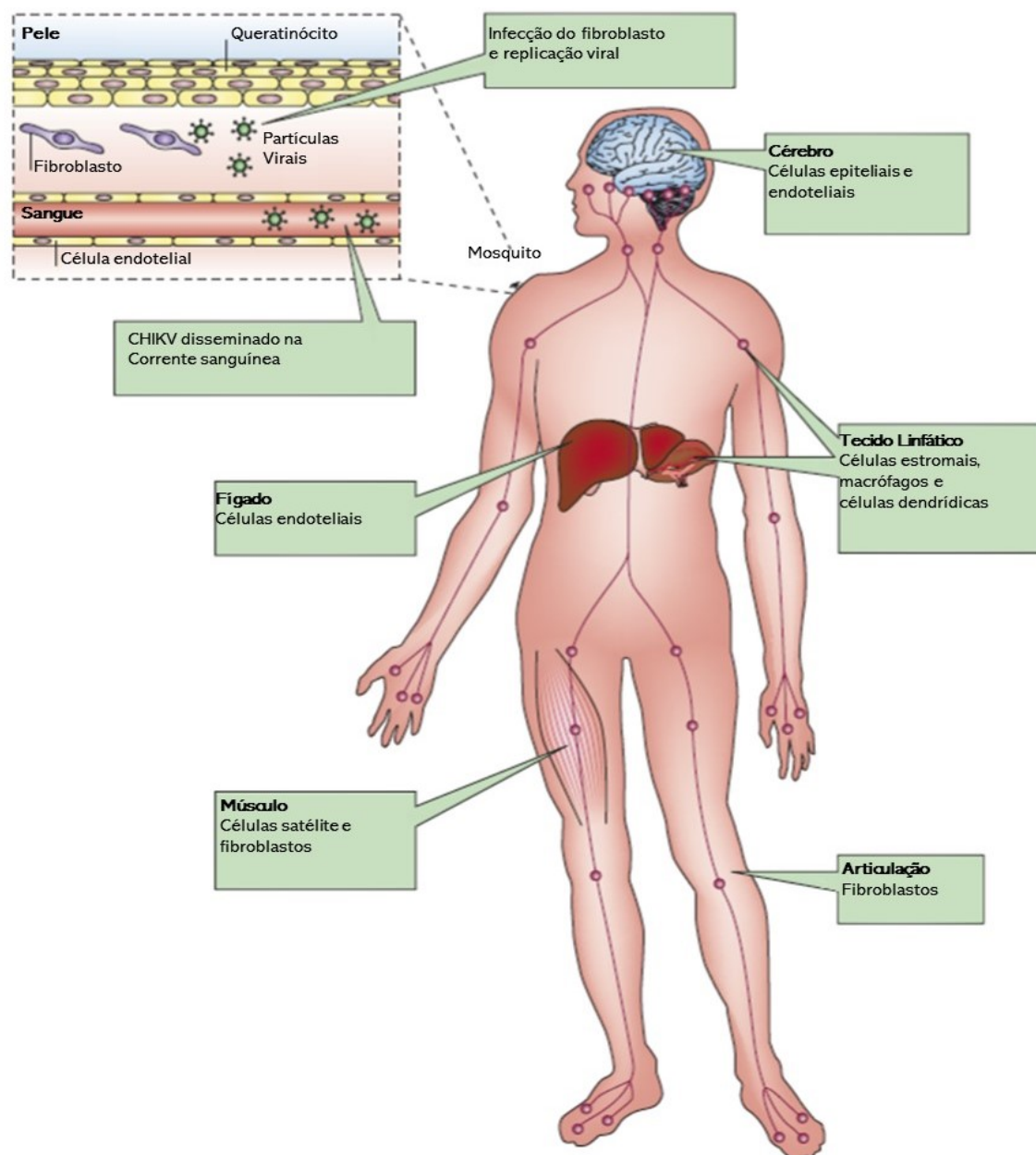


Fonte: Ministério da Saúde, 2020¹

¹Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/chikungunya> Acesso em 01/09/2020

Estudos reportaram que o CHIKV pode invadir as células endoteliais e fibroblastos subcutâneos, atingindo também os macrófagos, que são responsáveis por transportar o vírus para os órgãos alvo como músculos e articulações, onde há grande quantidade de células nervosas, além de cérebro e fígado (Figura 5) (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016; MÜLLER et al., 2019; WONG; CHU, 2018). Após alguns meses, a artralgia pode se tornar crônica em aproximadamente 25% dos indivíduos infectados, comprometendo as atividades diárias e levando a impacto social e econômico (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016; NERIS et al., 2018; PAIXÃO et al., 2018). Apesar das mortes causadas pelo CHIKV serem raras, a maioria das vítimas fatais são idosos com idade acima de 60 anos e crianças menores de 1 ano (LIMA NETO et al., 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Figura 5- Disseminação do CHIKV pós infecção.



Disseminação das partículas virais via corrente sanguínea após a infecção. Adaptado de (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

1.3. Tratamento atual da Febre Chikungunya

Não existe terapia antiviral contra a febre Chikungunya, sendo o tratamento atual baseado em medidas paliativas, visando reduzir os sintomas. Este tratamento paliativo envolve o uso de analgésicos, antitérmicos, repouso e hidratação (SAÚDE, BRASIL. MINISTÉRIO DA. SAÚDE, 2017).

1.4. Propriedades biológicas e potencial antiviral da própolis vermelha

As plantas são popularmente usadas de forma medicinal para prevenir ou auxiliar no tratamento de doenças (BARBALHO et al., 2016). Alguns extratos vegetais e compostos puros isolados de fontes naturais tem sido testados e podem ser importantes ferramentas no tratamento de infecções por vírus (SILVEIRA et al., 2009). A própolis é um substrato produzido por abelhas, de aspecto resinoso e balsâmico, com composição variável, possuindo alto potencial biotecnológico devido a suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas (LÓPEZ et al., 2014), antiparasitárias, antitumoral, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, hepatoprotetoras (SANTOS et al., 2020), e antivirais, como aquelas descritas para os vírus da gripe, adenovírus, herpes simples e herpes genital (POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2019; SCHNITZLER et al., 2010).

A própolis pode ser encontrada em várias regiões do Brasil e do mundo, e sua composição depende das variações botânicas locais (LÓPEZ et al., 2014). A própolis vermelha é normalmente encontrada no nordeste brasileiro, diferenciando-se dos outros tipos de própolis pela elevada presença de compostos fenólicos como, por exemplo, isoflavonóides, chalconas, pterocarpanos, benzofenonas, terpenos e taninos (DO NASCIMENTO et al., 2019).

Os isoflavonóides, presentes em alguns alimentos, inclusive na própolis vermelha, são capazes de exercer atividades benéficas ao ser humano (OLDONI et al., 2011). Dentre eles estão o vestitol, o neovestitol e a medicarpina (FERNÁNDEZ et al., 2008; OLDONI et al., 2011). O vestitol demonstrou atividade antitumoral, anti-inflamatória, anticáries, antioxidante e capacidade de modulação de neutrófilos (BUENO-SILVA et al., 2013b; FRANCHIN et al., 2016b; FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016; INUI et al., 2014; NANI et al., 2018). O neovestitol, por sua vez, é um dos principais componentes bioativos presente na própolis vermelha, tendo demonstrado atividade anti-inflamatória, reduzindo a migração de neutrófilos em modelos animais (BUENO-SILVA et al., 2017) e diminuindo o dano articular em animais com artrite induzida (FRANCHIN et al., 2016a). Mais além, ele apresentou atividades antibacteriana e anticárie (BUENO-SILVA et al., 2013a). Por fim, a medicarpina apresentou atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral *in vitro* (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016; GATOUILLAT et al., 2015), e atividade lipolítica e anti-osteoclastogênica, capazes de prevenir artrite pós menopausa em camundongos (IMRAN et al., 2018; MANSOORI et al., 2020).

Desta maneira, visto a inexistência de tratamento antiviral específico contra a febre Chikungunya e, dados as informações da literatura referente à potencial atividade antiviral destes compostos, este trabalho tem por hipótese de que os compostos isolados do extrato de própolis sejam moléculas com potencial antiviral frente ao CHIKV. De modo a avaliar esta hipótese, este trabalho tem como objetivo analisar a atividade antiviral do vestitol, neovestitol e medicarpina na replicação do CHIKV *in vitro*.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com a situação epidemiológica atual, as arboviroses representam impacto socioeconômico significativo, no que se ressalta o impacto no sistema de saúde, provocando superlotação com internações, afastamentos e incapacitação por doença crônica, más formações congênitas em crianças e altos números de óbitos, resultando em gastos de cerca de 3 bilhões de reais anualmente.

O CHIKV tem caráter endêmico em regiões tropicais, sendo notificado no Brasil durante todo o ano. Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde reportaram que entre os anos de 2015 e 2019 foram confirmados 593 óbitos por Chikungunya no país. Os sintomas da doença comprometem as atividades dos indivíduos infectados e a infecção pelo CHIKV pode se tornar crônica, o que interfere na qualidade de vida dos pacientes (PAIXÃO et al., 2018). Adicionalmente, não existem fármacos antivirais ou vacinas para combater esse vírus (WANG; ZHANG, 2019), sendo de suma importância a pesquisa de uma terapêutica adequada e acessível para a população atingida, utilizando, por exemplo, compostos naturais, que figuram entre os compostos promissores a serem utilizados no tratamento e prevenção de doenças (ÖZASLAN; OGUZKAN, 2018).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral dos isoflavonóides vestitol, neovestitol e medicarpina, na replicação do CHIKV *in vitro*.

3.1. Objetivos específicos:

- Estabelecer uma linhagem celular de células BHK-21 que expressem continuamente o *replicon* subgenômico CHIKV – NCT (BHK-CHIKV- NCT);

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos na linhagem continua de BHK-CHIKV
- NCT por meio de ensaio MTT de viabilidade celular e determinar a máxima concentração não-citotóxica de cada composto;
- Investigar o potencial antiviral do vestitol, neovestitol e medicarpina na replicação do CHIKV *in vitro* utilizando a linhagem continua de BHK-CHIKV – NCT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Compostos

Os isoflavonóides vestitol, neovestitol e medicarpina (Figura 6) foram cedidos gentilmente pelo Professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os compostos foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO), mantidos em solução estoque a -80°C e dissolvidos em meio de cultura celular imediatamente antes da realização dos ensaios em cultura de células.

Figura 6- Estrutura química dos compostos avaliados nesse estudo.

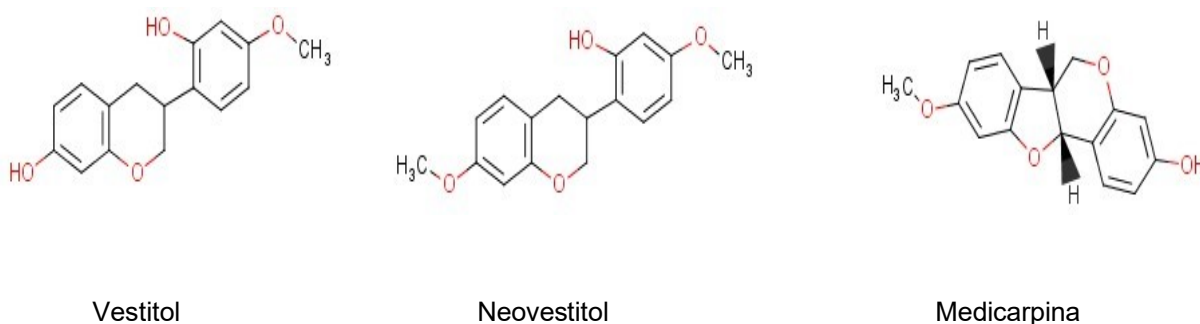


Figura cedida por: Prof. Dr. Fernando R. G. Bergamini, Instituto de química, Universidade Federal de Uberlândia.

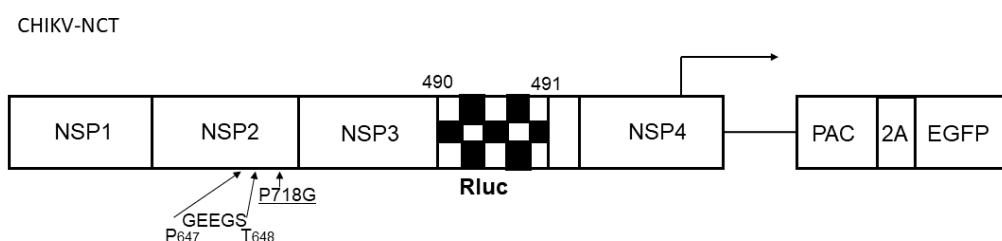
4.2. Cultura de Células

Células BHK-21 (ATCC® CCL-10™) foram cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco's (DMEM; GIBCO-BRL) suplementado com 100 U de penicilina por ml, 100 U de estreptomicina por ml, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (GIBCO-BRL), e foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 .

4.3. *Replicon* subgenômico de CHIKV

O *replicon* subgenômico CHIKV-NCT (Figura 5) foi utilizado para o estabelecimento da linhagem estável BHK-CHIKV-NCT. Esta construção foi gentilmente cedida pelo Prof. Andres Merits do *Institute of Technology, University of Tartu, Estonia* (Instituto de Tecnologia da Universidade de Tartu, Estônia), para o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia. O *replicon* CHIKV-NCT contém regiões que codificam as proteínas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, os *reporters* RLUC (*Renilla luciferase*) e EGFP (*Proteína de fluorescência verde – Green Fluorescence Protein*), a enzima PAC (*Puromicina N-acetiltransferase – Puromycin N-acetyltransferase*) que confere resistência ao antibiótico Puromicina, e a GEEGS (Glicina, ácido glutâmico, ácido glutâmico, glicina e serina), uma mutação que confere a inserção de cinco aminoácidos entre os resíduos 647 e 648 da nsP2, para diminuir a virulência do *replicon* (POHJALA et al., 2011).

Figura 7- Representação esquemática do *replicon* subgenômico CHIKV-NCT.



Adaptado de (POHJALA et al., 2011)

4.4. Preparação do RNA do *replicon* CHIKV para transfecção das células

Bactérias *E. coli* DH5α foram transformadas com plasmídeo pCHIKV – NCT. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB sólido com 50 µg/mL de ampicilina a 37°C por 16 h. Uma única colônia foi cultivada em meio LB líquido adicionado de ampicilina, em seguida foi realizada a purificação e extração plasmidial por meio do QUIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos recuperados foram linearizados por meio da enzima de restrição NOT I (Promega, USA), e purificados por meio do kit de purificação DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial e o DNA linear foram aplicados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo para confirmar a linearização e qualidade dos

mesmos. O produto da linearização foi então submetido à síntese do RNA do *replicon* por meio do kit SP6 Ribo MAX™ Express RNA Production System (Invitrogen, USA). Após a síntese, o ácido nucléico foi tratado com a enzima Turbo DNase (Promega, USA) para a eliminar fitas de DNA remanescentes.

4.5. Estabelecimento da linhagem celular estável BHK-CHIKV-NCT

Células BHK-21 foram submetidas à transfecção por eletroporação, método que consiste em submeter as células a um campo elétrico capaz de aumentar a permeabilidade das membranas, permitindo a entrada do RNA do *replicon*. Para isso, 4×10^6 células BHK-21 em solução tampão fosfato salino (Phosphate buffered saline – PBS) gelado foram transferidas para cubeta de eletroporação juntamente com 10 µg do RNA do *replicon*, seguido de dois pulsos a 450 Volts e 650 µF de capacitância. As células eletroporadas foram transferidas para garrafa de cultivos e mantidas com meio DMEM suplementado a 37°C e 5% de CO² por 24 horas, com posterior análise da presença de fluorescência para confirmar a expressão do *replicon*. As células BHK-CHIKV-NCT foram mantidas sob seleção e expansão por aproximadamente 15 dias, sob o tratamento com meio DMEM suplementado e adicionado de puomicina 5 µg/mL. A visualização das mesmas foi realizada em microscópio de fluorescência. Após o período de seleção, foi realizado ensaio de luminescência a fim de comprovar a expressão do gene repórter RLUC.

4.6. Ensaio de viabilidade em células BHK-CHIKV-NCT

Para determinar a citotoxicidade dos compostos 1×10^4 células BHK-CHIKV-NCT foram transferidas para microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, foi adicionado meio de cultura contendo os compostos nas concentrações de 50, 10, 2 e 0,4 µM e as células foram incubadas por 72 horas. Após esse intervalo, o sobrenadante foi removido e as células foram adicionadas de solução contendo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, USA) a 1mg/mL em meio de cultura e incubadas a 37°C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido e substituído pelo mesmo volume de Dimetil sulfóxido (*Dimetilsulfóxido* - DMSO) e submetida à leitura de comprimento de onda a 490 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela média dos poços tratados x 100/ média dos poços do controle não tratado. Os ensaios foram realizados em

triplicata e em pelo menos dois eventos independentes. DMSO foi utilizado como controle não tratado. Para análise antiviral, uma concentração com viabilidade celular igual ou superior a 80% foi selecionada.

4.7. Ensaio antiviral em *replicon* subgenômico

Para avaliar o efeito dos compostos na replicação do CHIKV, 1×10^4 células BHK-CHIKV- NCT foram transferidas para microplacas de 96 poços branca, 24 h antes do teste de atividade antiviral. Após aderência celular, os compostos foram adicionados em concentrações selecionadas de acordo com o ensaio de MTT e incubado por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura contendo os compostos foi removido, as células foram lavadas com PBS e adicionadas de tampão de lise passiva (Renilla luciferase lysis buffer; Promega, USA) por 30 min. Aos lisados celulares foi adicionado reagente de Renilla Luciferase (*Renilla Luciferase Assay Reagent*; Promega, USA) para mensurar os níveis de luminescência, que foi detectada em leitor de placa Glomax® (Promega, USA). Todos os dados foram obtidos a partir da média dos poços tratados x 100/ média dos poços do controle não tratado. Os valores obtidos da leitura de atividade de luminescência foram analisados em planilha Excel e pelo software Graph Pad Prism© versão 8.0.1.

4.8. Estatística

Os ensaios foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) ou teste T-student utilizando o software Graph Pad Prism © versão 8.0.1 com valores de $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

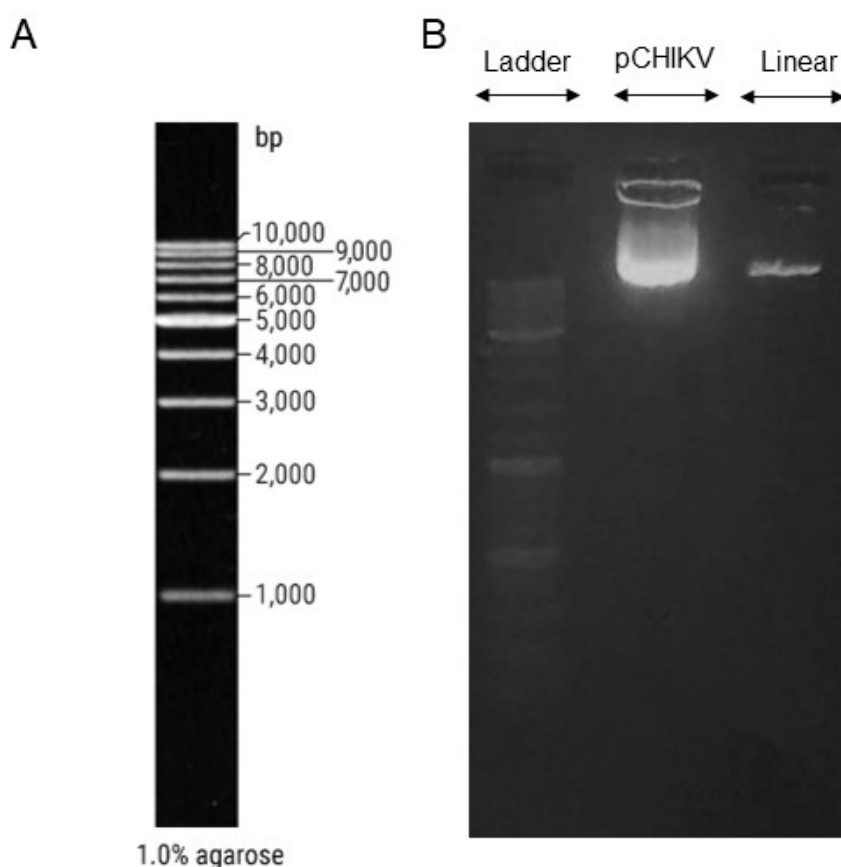
5.1. Estabelecimento da linhagem estável de BHK-CHIKV- NCT

Para a obtenção da massa necessária do DNA plasmidial contendo a sequência do *replicon* CHIKV-NCT, bactérias *E. coli* DH5- α competentes foram transformadas com o plasmídeo pCHIKV-NCT. As bactérias transformadas foram multiplicadas e submetidas à extração e purificação do plasmídeo, que foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop®, ThermoScientific) (Tabela 1). O DNA plasmidial foi então submetido à linearização, purificação e quantificação. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% e brometo de etídeo (Figura 8).

Tabela 1- Quantificação em espectrofotômetro do Plasmídeo CHIKV-NCT e DNA linear.

Plasmídeo	1000 ng/μl
DNA Linear	112,6 ng/μl

Figura 8- Visualização em gel de agarose 1% e brometo de etídeo

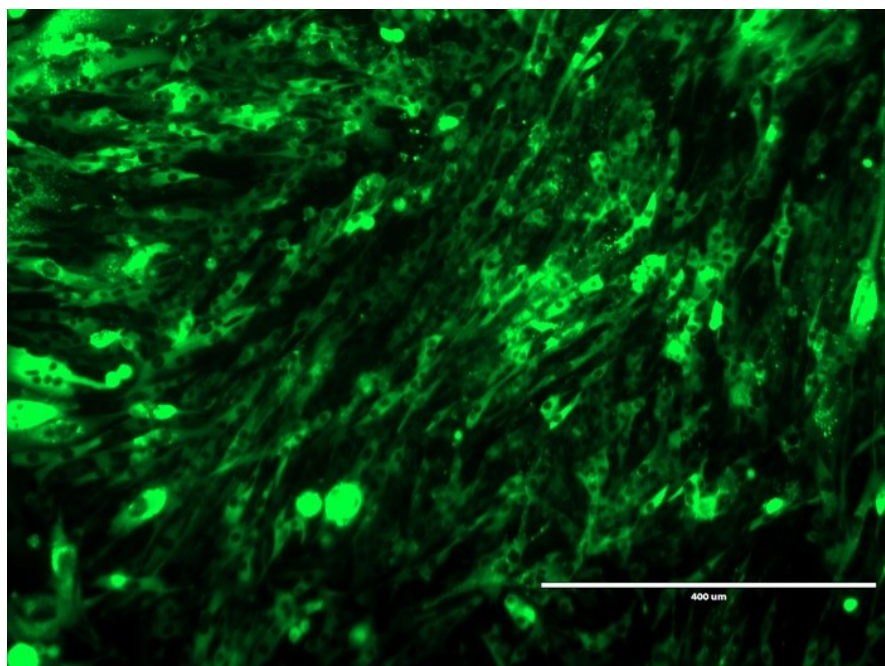


(A) Marcador molecular de 1kb (Ladder). **Fonte:** Promega Corporation⁴, 2020. (B) Ladder de 1kb, Plasmídeo CHIKV-NCT e DNA linear visualizados em gel de agarose 1% e brometo de etídeo sob luz ultravioleta. ⁴Disponível em: <https://www.promega.com.br/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/1kb-dna-step-ladder/?catNum=G6941> Acesso em 30/06/2020.

O DNA linear foi submetido a síntese de RNA do CHIKV-NCT, que foi transfectado em células BHK-21 através de eletroporação em dois pulsos. As células eletroporadas foram submetidas a seleção com antibiótico puomicina, a fim do estabelecimento de linhagem celular contendo apenas células que expressassem o *replicon*, obtida após 15 dias do início da seleção (Figura 9). Para isso, as células

BHK-21 que expressavam o *replicon* CHIKV-NCT foram mantidas em puromicina 5 $\mu\text{g/mL}$ e observadas constantemente em microscópio de fluorescência para confirmação da expressão do RNA CHIKV-NCT nas células através do EGFP (Figura 9). A linhagem estável foi denominada BHK-CHIKV-NCT.

Figura 9- Fluorescência emitida por células BHK-CHIKV-NCT.



Células BHK-21 expressando RNA CHIKV- NCT observadas em microscópio de imunofluorescência (EVOS) com objetiva de 4x e com filtro GFP (509 nm).

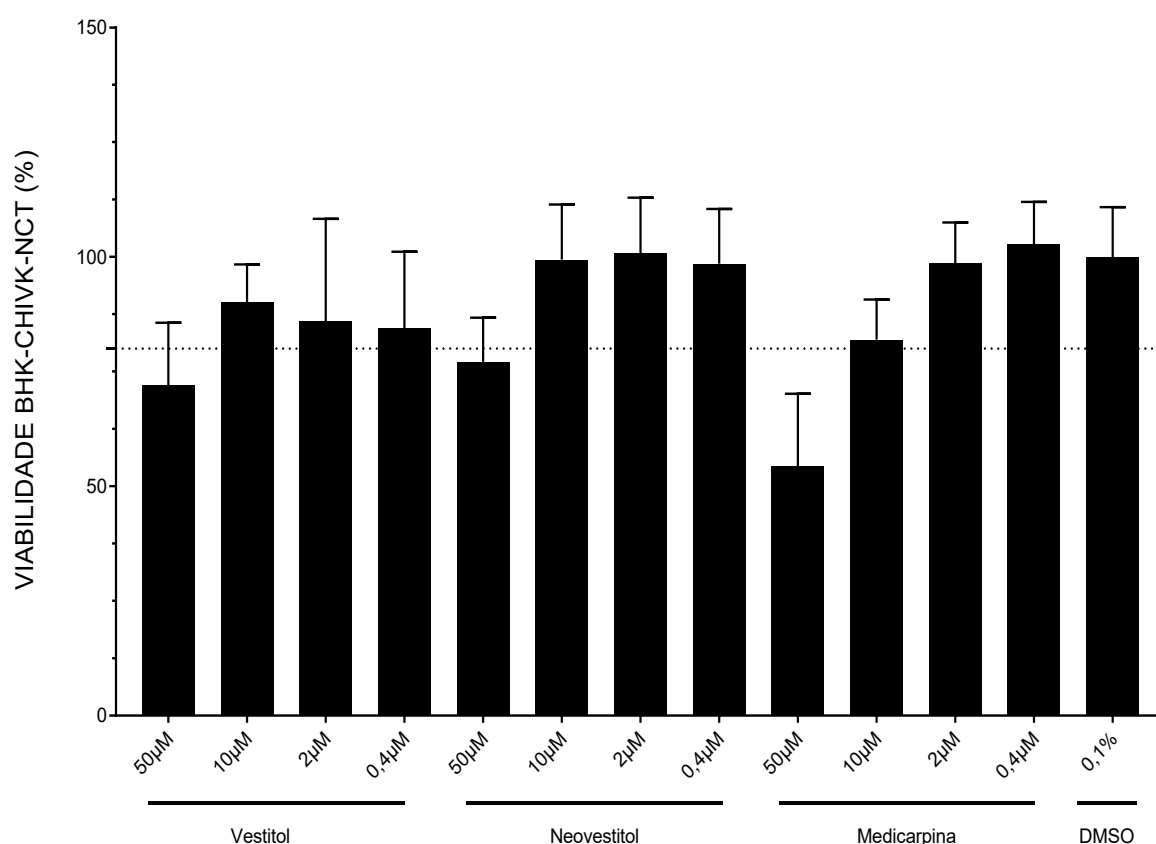
5.2. Ensaio de viabilidade em células BHK-CHIKV-NCT

Para estabelecer a concentração não citotóxica dos compostos a ser utilizada no ensaio antiviral, células BHK-CHIKC-NCT foram tratadas com vestitol, neovestitol e medicarpina nas concentrações de 50, 10, 2 e 0.4 μM . De acordo com os resultados obtidos, concentrações não citotóxicas, definidas como aquelas com viabilidade celular igual ou superior a 80%, para cada composto foram selecionadas para realização dos ensaios antivirais, que representaram o tratamento a 10 μM para todos os compostos avaliados. (Tabela 2; Figura 10).

Tabela 2- Viabilidade celular, expressa em porcentagem, na presença de cada composto em diferentes concentrações.

Composto	50 μ M	10 μ M	2 μ M	0.4 μ M
Vestitol	72.01	90.17	86.01	84.39
Neovestitol	77.09	99.41	100.83	98.51
Medicarpina	54.38	81.93	98.62	102.69

Figura 10- Viabilidade em células BHK-CHIKV-NCT tratadas com os compostos vestitol, neovestitol e medicarpina.



Viabilidade celular de BHK-CHIKV-NCT tratadas com os compostos nas concentrações de 50, 10, 2 e 0,4 μ M ou controle DMSO a 0,1%, mensurada através do ensaio de MTT.

5.3. Ensaio de luminescência em células BHK-CHIKV-NCT

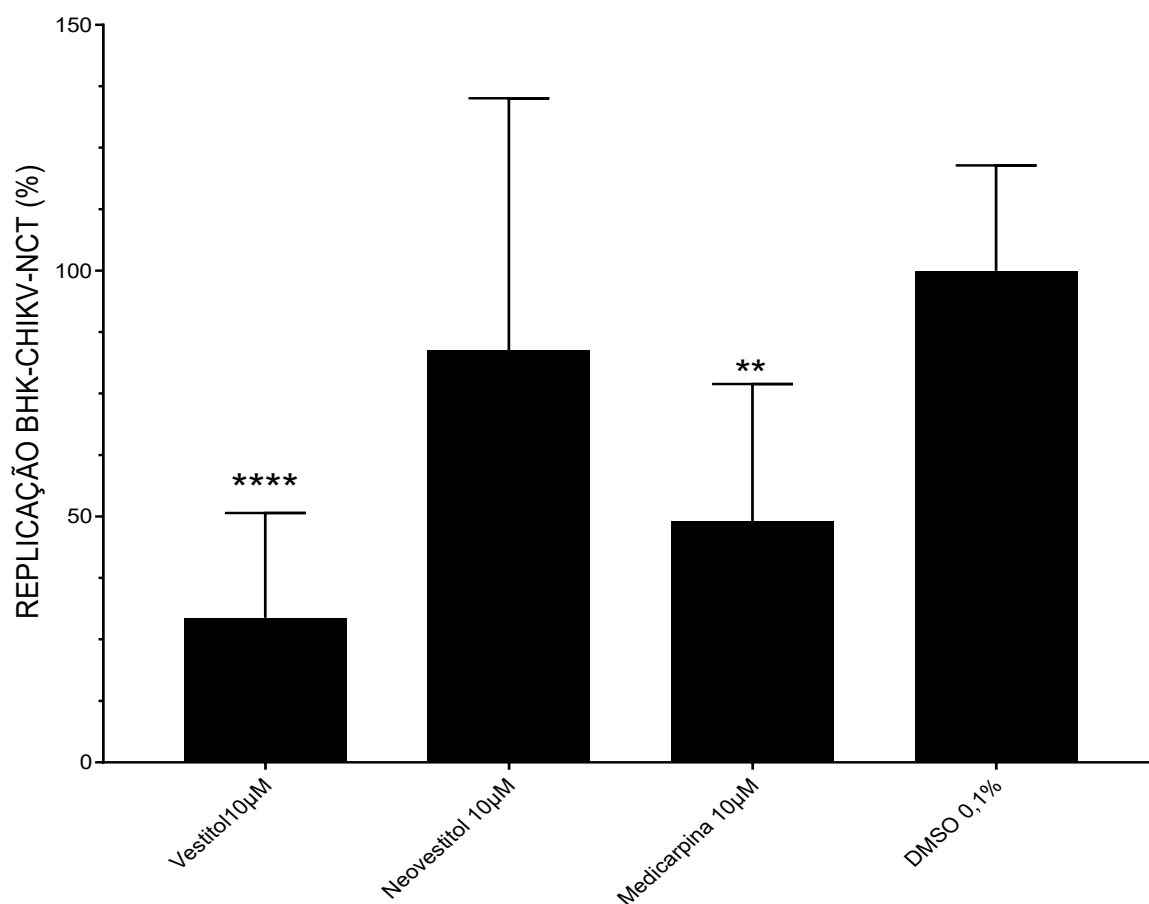
A atividade antiviral dos compostos foi avaliada na replicação CHIKV *in vitro* a partir do tratamento da linhagem celular BHK-CHIKV-NCT com vestitol, neovestitol e medicarpina na concentração de 10 μ M. Os resultados demonstraram redução estatisticamente significativa da replicação do CHIKV *in vitro* em 71% e 51% no tratamento com vestitol e medicarpina, respectivamente. As células tratadas com o

neovestitol não apresentaram inibição significativa na replicação do CHIKV *in vitro* (Tabela 3; Figura 11).

Tabela 3- Luminescência em células BHK-CHIKV-NCT tratadas com os compostos a 10 μ M/mL.

Composto	10 μ M
Vestitol	29.42
Neovestitol	83.76
Medicarpina	49.05

Figura 11- Atividade anti-CHIKV dos isoflavonóides vestitol, neovestitol e medicarpina.



Níveis de replicação do CHIKV em células BHK-CHIKV-NCT tratadas com os compostos a 10 μ M, determinados pelos níveis de luminescência em relação ao controle não tratado (DMSO). (**- $p < 0,0001$; **** - $p = 0,0025$).

6. DISCUSSÃO:

O CHIKV é problema de saúde pública em todo o mundo, causando comorbidades que podem se tornar graves, incapacitando indivíduos ou até mesmo os levando a óbito. Até o presente momento, não existem vacinas regulamentadas que possa impedir a infecção pelo vírus ou fármacos antivirais específicos para tratamento dos infectados. O tratamento é paliativo, realizado para minimizar os sintomas. Desta forma, a busca por moléculas que possam apresentar atividade antiviral contra o vírus é fundamental (MATUSALI et al., 2019; ZHANG et al., 2019). Nesse contexto, os compostos naturais são uma fonte alternativa para descoberta de novas terapêuticas (ÖZASLAN; OGUZKAN, 2018), que possam ser utilizadas no tratamento da febre Chikungunya.

A própolis vermelha apresenta uma variedade de compostos naturais com atividades biológicas e farmacológicas já descritas (FASOLO et al., 2016). Dentre eles, estão os isoflavonóides, uma classe de compostos que já demonstrou atividade antiviral contra o Enterovirus (SILVA-BELTRÁN et al., 2019) e o CHIKV (LANI et al., 2015, 2016). Zakaryan e colaboradores apresentaram em trabalho de revisão bibliográfica vários flavonóides com capacidade de inibir o CHIKV, caracterizando essa classe de compostos como promissores antivirais (ZAKARYAN et al., 2017). Porém, as atividades antivirais do vestitol, neovestitol e medicarpina contra o CHIKV não foram descritas até o momento.

Os ensaios antivirais realizados com a linhagem celular estável BHK-CHIKV-NCT mostraram que os compostos vestitol e medicarpina reduzem 71% e 51% a replicação do CHIKV, respectivamente, em relação ao controle não tratado. Pohjala e colaboradores utilizaram a mesma metodologia apresentada neste trabalho e avaliaram a atividade anti-CHIKV de flavonóides e cumarinas, sugerindo esses compostos como potenciais inibidores da replicação viral (POHJALA et al., 2011). Os autores também demonstraram que outros flavonoides como apigenina, crisina, narigenina e silibina apresentaram inibição da replicação viral, utilizando linhagem celular estável BHK-CHIKV-NCT (POHJALA et al., 2011). Adicionalmente, Lani e colaboradores mostraram que a silimarina, que contém o flavonoide silibinina como principal componente, inibiu em 93,4% a replicação do CHIKV na linhagem celular BHK-CHIKV-NCT (LANI et al., 2015). Em estudo posterior, os autores apresentaram os flavonóides fisteína, bicafeína e quercetagenina como potenciais inibidores da replicação do CHIKV (LANI et al., 2016).

Existem poucos dados na literatura descrevendo estudos antivirais utilizando compostos isolados da própolis, em especial, envolvendo a própolis vermelha e o CHIKV. Nossos estudos mostraram que os compostos estudados merecem ensaios adicionais para comprovar sua eficácia sobre a replicação das células *in vitro* e, adicionalmente, em modelos *in vivo*, a fim de verificar a ação dos mesmos em um sistema completo com perspectiva de criação de novos fármacos antivirais contra o CHIKV.

7. CONCLUSÃO:

Este estudo demonstrou que os compostos vestitol e medicarpina, isolados da própolis vermelha, foram capazes que inibir a replicação do CHIKV *in vitro*. Para o nosso conhecimento, esta é a primeira descrição da atividade anti-CHIKV de compostos isolados de própolis vermelha até o momento. Este dado pode ser útil para o desenvolvimento de futuros antivirais contra o CHIKV, que poderão proporcionar um avanço relevante para a saúde pública no tratamento da febre Chikungunya.

8. REFERÊNCIAS:

- AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. **Chikungunya risk for Brazil** *Revista de Saude Publica*, 2015.
- BARBALHO, S. M. et al. *Pereskia aculeata* Miller Flour: Metabolic Effects and Composition. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 9, p. 890–894, set. 2016.
- BRASIL.; SAÚDE, M. DA; SAÚDE, S. DE V. EM. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 32, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. 34, p. 11–17, 2020.
- BRASIL.; SAÚDE, M. DA; SAÚDE, S DE V. EM. Monitoramento dos casos de arboviroses transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 36, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. 38, p. 14-20, 2020.
- BRIZZI, K. Neurologic Manifestation of Chikungunya Virus. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 2, 2017.
- BUENO-SILVA, B. et al. Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm *in vitro* and development of dental caries *in vivo*. **Biofouling**, v. 29, n. 10, p. 1233–1242, 2013a.
- BUENO-SILVA, B. et al. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol

and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546–4550, 15 maio 2013b.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 440–447, set. 2017.

BURT, F. J. et al. Review 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.

Chikungunya : manejo clínico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de

Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, 2017.

FASOLO, D. et al. Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology-based product and porcine skin and mucosa: Analytical and bioanalytical assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 124, p. 57–66, maio 2016.

FERNÁNDEZ, M. C. et al. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red cuban propolis samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9927–9932, 2008.

FRANCHIN, M. et al. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: Involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–12, 2016a.

FRANCHIN, M. et al. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 954–960, 22 abr. 2016b.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, mar. 2016.

- FROLOV I, FROLOVA EI. Molecular Virology of Chikungunya Virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 2019 Jan 1. doi: 10.1007/82_2018_146. Epub ahead of print. PMID: 30599050.
- GATOUILLAT, G. et al. Medicarpin and millepurpan, two flavonoids isolated from *Medicago sativa*, induce apoptosis and overcome multidrug resistance in leukemia P388 cells. **Phytomedicine**, v. 22, n. 13, p. 1186–1194, dez. 2015.
- HOORNWEG, T. E. et al. Dynamics of Chikungunya Virus Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells. **Journal of Virology**, v. 90, n. 9, p. 4745–4756, 1 maio 2016.
- IMRAN, K. M. et al. Medicarpin induces lipolysis via activation of Protein Kinase A in brown adipocytes. **BMB Reports**, v. 51, n. 5, p. 249–254, 31 maio 2018.
- INUI, S. et al. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1293–1296, 18 ago. 2014.
- LANI, R. et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11421, 16 set. 2015.
- LANI, R. et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 133, p. 50–61, set. 2016.
- LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de saude publica**, v. 50, p. 1–7, 2016.
- LIMA NETO, A. S. et al. **Chikungunya-attributable deaths: A neglected outcome of a neglected disease** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019.
- LÓPEZ, B. G.-C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, mar. 2014.
- MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. **Chikungunya: Bending over the Americas and the rest of the world** *Brazilian Journal of Infectious Diseases* Elsevier Editora Ltda, , jan. 2016.
- MANSOORI, M. N. et al. Medicarpin prevents arthritis in post-menopausal conditions by arresting the expansion of TH17 cells and pro-inflammatory cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 82, n. January, p. 106299, maio 2020.
- MARTINS, D. O. S. et al. Antivirals against chikungunya virus: Is the solution in nature? **Viruses**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2020.
- MATUSALI, G. et al. Tropism of the chikungunya virus. **Viruses**, v. 11, n. 2, 2019.
- MEJÍA, C.-R.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Alfavirus tropicales artritogénicos. **Reumatología**

Clínica, v. 14, n. 2, p. 97–105, mar. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes, SE 01 a 52. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2020.

MÜLLER, M. et al. Chikungunya virus requires cellular chloride channels for efficient genome replication. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. e0007703, 4 set. 2019.

NANI, B. D. et al. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. **Phytotherapy Research**, 2018.

NERIS, R. L. S. et al. Co-protoporphyrin IX and Sn-protoporphyrin IX inactivate Zika, Chikungunya and other arboviruses by targeting the viral envelope. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9805, 28 dez. 2018.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208–213, 2011.

ÖZASLAN, M.; OGUZKAN, S. B. Use of Plant Extracts in Alternative Medicine. **Pak. J. Biol. Sci.**, n. 21, p. 1–7, 2018.

PAIXÃO, E. S. et al. Chikungunya chronic disease: A systematic review and meta-analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 7, p. 301–316, 2018.

POHJALA, L. et al. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V. **Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity**PhytomedicineElsevier GmbH, , 2019.

ROSS, R. W. The newala epidemic: III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 15 jun. 1956.

SANTOS, L. M. et al. **Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting**Journal of the Science of Food and Agriculture, 5 set. 2020.

SCHNITZLER, P. et al. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. S20–S28, jan. 2010.

- SCHWARTZ, OLIVIER. et al. Biology and pathogenesis of chikungunya vírus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010.
- SILVA-BELTRÁN, N. P. et al. Antiviral effects of Brazilian green and red propolis extracts on Enterovirus surrogates. **Environmental Science and Pollution Research**, 30 dez. 2019.
- SILVA, N. M. DA et al. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e serviços de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. 3, p. e2017127, nov. 2018a.
- SILVA, J. V. J. et al. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Tropica**, v. 188, n. September, p. 213–224, 2018b.
- SILVEIRA, C. S. et al. In vitro cytotoxic, antioxidant and antiviral effects of Pterocaulon alopecuroides and Bidens segetum extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2a, p. 343–348, jun. 2009.
- SUDEEP, A. B. et al. Differential susceptibility & replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C6/36 cells & Aedes aegypti mosquitoes to three strains of chikungunya virus. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 6, p. 771–777, 2019.
- 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.
- WANG, P.; ZHANG, R. **Chikungunya virus and (Re-) emerging alphaviruses** **Viruses**, 24 ago. 2019.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 26 mar. 2015.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, fev. 2010.
- WONG, K. Z.; CHU, J. J. H. **The interplay of viral and host factors in chikungunya virus infection: Targets for antiviral strategies** **Viruses**, 30 maio 2018.
- WU, P. et al. Arbovirus lifecycle in mosquito: Acquisition, propagation and transmission. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 21, 2019.
- YAP, MOH LAN. et al. Structural studies of Chikungunya virus maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 52, p. 13703-13707, 2017.

ZAKARYAN, H. et al. **Flavonoids: promising natural compounds against viral infections***Archives of Virology*Springer-Verlag Wien 2017, , 2017.

ZHANG, Y.-N. et al. Infectious Chikungunya Virus (CHIKV) with a Complete Capsid Deletion: a New Approach for a CHIKV Vaccine. **Journal of Virology**, v. 93, n. 15, p. 1–16, 2019.