

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

GRAZIELLE LOBO COELHO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS *IN VITRO*
CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA EM SINOVIÓCITOS HUMANOS
SEMELHANTES A FIBROBLASTOS (HFSL)**

MACEIÓ

2021

GRAZIELLE LOBO COELHO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS *IN VITRO*
CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA EM SINOVIÓCITOS HUMANOS
SEMELHANTES A FIBROBLASTOS (HFLS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas,
Bacharelado, da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito parcial para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ênio José Bassi

MACEIÓ

2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

C672a Coelho, Grazielle Lobo.
Atividade antiviral da própolis vermelha de Alagoas *in vitro* contra o vírus chikungunya em sinoviócitos humanos semelhantes a fibroblastos (HFSL) / Grazielle Lobo Coelho. – 2022.
43 f. : il. color.

Orientador: Ênio José Bassi.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 39-43.

1. Chikungunya. 2. Infecções por arbovírus. 3. Própolis vermelha de Alagoas. 4. Atividade antiviral. I. Título.

CDU: 638.135: 578.833.1/.2



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE MONOGRAFIA

Aos 22 de dezembro de 2021, às 14 horas, estiveram reunidos na sala virtual <https://meet.google.com/iik-xgax-jgf>, pela Plataforma Google Meet, como Presidente da Banca Examinadora, o orientador Prof. Dr. Ênio José Bassi e os Membros Titulares, o Dr. Axel Helmut Rulf Cofré e o Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior, para a apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso do(a) discente **GRAZIELLE LOBO COELHO**, matrícula **16110796**, intitulado **"ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS IN VITRO CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA EM SINOVIÓCITOS HUMANOS SEMELHANTES A FIBROBLASTOS (HFLS)"**. Após a apresentação pelo aluno(a), seguiu-se a arguição da Banca Examinadora, sendo este Trabalho APROVADO com nota 9,60 (nove inteiros e seis décimos). *Ficam cientes o(a) orientador(a) e o(a) discente que a nota final do TCC somente será registrada no sistema acadêmico após o orientador enviar o TCC corrigido, por e-mail e em versão final "PDF", à Coordenadoria do Curso, cumprindo assim a obrigatoriedade da entrega definitiva prevista no inciso III, art. 18, Res. 25/2005/CEPE/UFAL.* Nada mais havendo a tratar, eu, Prof.^a Dr.^a Graziela Cury Guapo, lavrei a presente Ata, que vai por mim assinada, e pelos Membros da Banca Examinadora.

Maceió, 22 de dezembro de 2021.

Documento assinado digitalmente
gov.br Ênio José Bassi
Data: 25/12/2021 10:34:41-0300
Verifique em <https://verificador.jf.br>

Prof. Dr. Ênio José Bassi
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente
gov.br AXEL HELMUT RULF COFRE
Data: 24/12/2021 16:50:06-0180
Verifique em <https://verificador.jf.br>

Dr. Axel Helmut Rulf Cofré
Membro Titular - Examinador(a) 1

Documento assinado digitalmente
gov.br Edeildo Ferreira da Silva Junior
Data: 24/12/2021 17:53:58-0180
Verifique em <https://verificador.jf.br>

Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior
Membro Titular - Examinador(a) 2

Prof. Dr. Gilberto Costa Justino
Vice-Coordenador - SIAPE 191614-
Ciências Biológicas - Bacharelado
Universidade Federal de Alagoas

Documento assinado digitalmente
gov.br Gilberto Costa Justino
Data: 05/10/2022 10:58:29-8300
Verifique em <https://verificador.jf.br>

Coordenadoria do Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas

*Aos meus pais, Carla e Juvemar, por sempre me guiar e
me desejar o melhor, para vida e carreira.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Carla e Juvemar, mesmo com todos os percalços da vida, nunca hesitaram em me dar o apoio necessário, desde o ingresso na universidade até aqui. Meu ingresso e permanência no grupo de pesquisa também é graças a vocês, meu muito obrigada! Amo vocês!

Aos amigos que cultivei durante a graduação, com eles aprendi muito sobre a vida, companheirismo e, principalmente, empatia. Agradeço ao Rafa pelo companheirismo durante a escrita desse trabalho e às “Biofriends”: Aminye, Carla Moura, Carla Brito, Camila, Isaelly, Luciana, Talita, Thaila e Roberta, minhas melhores amigas da graduação. Obrigada por compartilhar conhecimento em cada área da Biologia, pela amizade e por sempre me colocar pra cima.

A todos os professores que moldaram a pessoa e profissional que sou, especialmente Prof.^a Liriane Monte, Prof. Gilberto Costa, Prof. Robson Guimarães e todos demais que contribuíram para minha formação como bióloga.

Ao meu confidente, companheiro, amigo e amor, Hugo. Agradeço por todas as vezes que me acompanhou em minha jornada acadêmica, em feriados, datas comemorativas e finais de semana que me fez companhia no laboratório. Pela motivação diária, estar sempre ao meu lado nas minhas frustrações, nas vitórias e por ser um professor inspirador. Obrigada, meu bem!

À minha irmã, Maria Clara, suas perguntas mirabolantes sobre biologia me motivam e instigam a sempre querer estudar cada vez mais e saber mais sobre esse universo pra te contar.

Àqueles que estão comigo desde a infância, obrigada por compartilhar conselhos e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ênio José Bassi, que me deu a oportunidade de ingressar no LAPEVI e no IMUNOREG em 2018 onde desde então me encontrei, amo o que faço. Obrigada por todos os conselhos, correções e aulas e principalmente, por me ensinar como ser um pesquisador e motivar a nunca desistir diante dos obstáculos e desafios.

À Prof.^a Dr.^a Letícia Anderson por ser como minha coorientadora, também participando ativamente na minha formação e carreira na pesquisa, por guiar meu pensamento crítico, criatividade e instigar a vontade de sempre querer saber mais. Além de seu zelo e compreensão.

Aos meus amigos do LAPEVI/IMUNOREG: Elane, minha primeira tutora e inspiração, com você aprendi muito mais que o universo dos macrófagos e técnicas laboratoriais, muito do

que sou hoje devo aos seus ensinamentos; Steph, sou imensamente grata aos ensinamentos, pela sua paciência, resenhas e aperreios, admiro muito a mulher e professora que você é! Jamile, muito obrigada por sempre se dedicar e mergulhar de cabeça em qualquer assunto para nos ajudar e ensinar! Sua organização e criatividade me inspiram; João, um professor que também vai além da sala de aula, grande admiração por você. Muito obrigada por sempre me ajudar quando tudo que eu tinha eram perguntas; Júlia, obrigada por ser a professora em horários aleatórios e me permitir ser sua tutora também, aprendi muito em todos os momentos que compartilhamos; Káthia, muito obrigada por todas as vezes que sanou dúvidas, foi muito gratificante dividir a iniciação científica com você, te admiro!

À técnica de laboratório e professora Ana Rachel Vasconcelos, por sempre se disponibilizar a sanar nossas dúvidas, aflições e sempre com uma boa conversa e um café.

Ao Prof. Dr. Ticiano Gomes que nos cedeu o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas, primordial na execução desse trabalho.

Às agências de fomento que financiaram e tornaram possível a realização deste projeto: FAPEAL, CNPq e UFAL.

A todos que contribuíram e participaram dessa jornada, meu muito obrigada!

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus, transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* sp, que causa uma doença caracterizada na fase aguda por sintomas como: dores nas articulações, febre, dores de cabeça, mialgia, manifestações cutâneas e distúrbios do sistema digestivo. Esta arbovirose pode progredir para a fase crônica caracterizada como uma síndrome reumática crônica (SRC) persistente por meses ou anos e até o presente momento, não há antiviral específico para o tratamento desta doença. Entre compostos naturais com atividade antiviral, destaca-se a Própolis Vermelha de Alagoas (PVA), matéria natural resinosa produzida por abelhas *Apis mellifera* que apresenta diversas atividades biológicas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral do extrato hidroalcoólico (EH) da PVA contra o CHIKV em sinoviócitos humanos semelhantes a fibroblastos (HFLS) *in vitro*. Inicialmente, foi realizado o ensaio de citotoxicidade pela metodologia de MTT para determinação da concentração de uso, e observou-se a concentração de 100 µg/ml como a máxima não tóxica. Com isso, foram realizados ensaios de avaliação da atividade antiviral do em HFLS infectados com CHIKV (MOI = 0,5) tratados com diferentes concentrações da PVA (100 a 6,25 µg/mL) por 48h e posterior análise de viabilidade celular por MTT. Como resultado, uma atividade antiviral promissora foi detectada para as concentrações de 100 e 50 µg/mL sendo obtido uma CI₅₀ de 51,04 µg/mL e um índice de seletividade de 4,28. Além disso, foi realizada a marcação intracelular do vírus 48h após o tratamento seguido da análise da percentagem de células infectadas por citometria de fluxo intracelular. O tratamento com a PVA reduziu significativamente a percentagem de células positivas para o CHIKV de 48,95% no controle viral não tratado para 5,70% após tratamento com PVA. Posteriormente, foi avaliada a atividade antiviral da Biochanina A, um componente da PVA. O tratamento com a biochanina A (200 µM) mostrou uma atividade antiviral promissora contra o CHIKV *in vitro*, reduzindo a percentagem de células infectadas de 27,06% no controle viral não tratado para 8,47% após tratamento. Assim, conclui-se que a PVA e o composto Biochanina A apresentaram uma promissora atividade antiviral contra o CHIKV em HFLS *in vitro*. Estes resultados podem contribuir para o futuro desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta arbovirose baseadas em compostos de origem natural.

Palavras-chave: Antiviral; Chikungunya; Própolis Vermelha; Sinoviócitos tipo B;

ABSTRACT

The Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus, transmitted by mosquitoes of the *Aedes* sp genus, which causes a disease characterized in the acute phase by symptoms such as: joint pain, fever, headaches, myalgia, skin manifestations and digestive system disorders. This arbovirus can progress to the chronic phase characterized as a chronic rheumatic syndrome (CRS) which persists for months or years, and so far, there is no specific antiviral for the treatment of this disease. Among natural compounds with antiviral activity, the Red Propolis of Alagoas (PVA) stands out, a natural resinous material produced by *Apis mellifera* bees that has several biological activities. In this way, the aim of this work was to evaluate the antiviral activity of the hydroalcoholic extract (EH) of PVA against CHIKV in human fibroblast-like synoviocytes (HFLS) in vitro. Firstly, the cytotoxicity assay was performed using the MTT methodology to determine the use concentration, and the concentration of 100 µg/ml was observed as the maximum non-toxic. Thus, assays were performed to evaluate the antiviral activity of HFLS infected with CHIKV (MOI = 0.5) treated with different concentrations of PVA (100 to 6.25 µg/mL) for 48h followed by analysis of cell viability by MTT. As result, a promising antiviral activity was detected at concentrations of 100 and 50 µg/mL, with an IC₅₀ of 51.04 µg/mL and a selectivity index of 4.28. In addition, intracellular virus labeling was performed 48h after treatment, followed by analysis of the percentage of infected cells by intracellular flow cytometry. PVA treatment significantly reduced the percentage of CHIKV positive cells from 48.95% in the untreated viral control to 5.70% after PVA treatment. Subsequently, the antiviral activity of Biochanin A, a component of PVA, was evaluated. Treatment with biochanin A (200 µM) showed promising antiviral activity against CHIKV in vitro, reducing the percentage of infected cells from 27.06% in the untreated viral control to 8.47% after treatment. Thus, it is concluded that PVA and the compound Biochanin A showed a promising antiviral activity against CHIKV in HFLS in vitro. These results can contribute to the future development of new therapeutic strategies for this arbovirus based on compounds of natural origin.

Keywords: Antiviral; Chikungunya; Red Propolis; Type B synoviocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura viral e genoma do CHIKV	14
Figura 2 – Distribuição dos vetores transmissores e genótipos circulantes do CHIKV	15
Figura 3 – Ciclo de replicação do vírus Chikungunya	16
Figura 4 – Sítios de replicação viral nas fases aguda e crônica da FCHIKV	19
Figura 5 – Frequência dos sintomas em pacientes acometidos pelo CHIKV na fase aguda	20
Figura 6 – Esquema representativo de sinóvia saudável e na artrite reumatoide	21
Figura 7 – Compostos bioativos presentes na Própolis Vermelha de Alagoas	24
Figura 8 – Microscopia óptica de ensaio de citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da PVA em HFLS após 48h	31
Figura 9 – Análise estatística da citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da Proópolis Vermelha de Alagoas em HFLS <i>in vitro</i>	32
Figura 10 – Microscopia óptica da atividade antiviral da Própolis Vermelha de Alagoas em fibroblastos sinoviais (HFLS)	33
Figura 11 – Análise estatística de inibição viral do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha de Alagoas contra o CHIKV em HFLS <i>in vitro</i>	34
Figura 12 – Detecção da percentagem de células infectadas pelo CHIKV por citometria de fluxo intracelular	35
Figura 13 – Análise estatística da atividade antiviral da Própolis Vermelha de Alagoas em sinoviócitos humanos semelhantes a fibroblastos (HFLS)	36
Figura 14 – Citometria de fluxo para análise da infecção viral de HFLS e ação antiviral da Biochanina A	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos prováveis de febre de Chikungunya, até a Semana Epidemiológica 52, por região e Unidade da Federação, Brasil, 2016	18
Tabela 2 - Grupos de antivirais licenciados	22
Tabela 3 - Diferentes grupos de própolis brasileira e suas propriedades biológicas	23
Tabela 4 - Atividades biológicas da Própolis Vermelha de Alagoas	24
Tabela 5 - Valores de CC ₅₀ CI ₅₀ e índice de seletividade (IS) da PVA	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR- Artrite reumatoide.

CHIKV- Vírus Chikungunya

CMNT- Concentração máxima não tóxica

DMSO- Dimetil-sulfóxido

EH- Extrato hidroalcoólico

EV-71- Enterovirus-71

FCHIKV- Febre Chikungunya

GM-CSF- *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)

HFLS – *Human fibroblast-like synoviocytes* (sinoviócitos humanos semelhantes a fibroblastos)

ICF- Instituto de Ciências Farmacêuticas

IL-1 β - Interleucina-1-Beta

IL-6- Interleucina-6

IL-8/CXCL-8: Quimiocina interleucina-8

MCP-1- *Monocyte chemoattractant protein-1* (Proteína 1 quimioatraente de monócitos)

MMP- Metaloproteinase de matriz

MOI- *Multiplicity of infection* (Multiplicidade de infecção)

MTT- [Brometo de (3-(4,5- dimetiltiazol-2yL)-2,5-difenil tetrazólio]

PVA- Própolis Vermelha de Alagoas

RD- Rabdomiossarcoma

SCR- Síndrome reumática crônica

TGF- β - *Transforming growth factor beta* (Fator de crescimento transformante beta)

TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha* (Fator de necrose tumoral alfa)

ZIKV- Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 O vírus Chikungunya	13
2.1.2 Ciclo de replicação viral do CHIKV	15
2.1.3 Chikungunya no Brasil.....	17
2.2 Interação vírus-hospedeiro	19
2.3 HFLS – Human Fibroblast-like Synoviocytes	20
2.4 Antivirais	22
2.5 Própolis	22
2.5.1 Própolis Vermelha de Alagoas	24
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha de Alagoas e preparação da solução de uso	28
4.2 Ensaio de citotoxicidade	28
4.3 Ensaio antiviral de pós-tratamento	29
4.4 Detecção da percentagem de células infectadas por citometria de fluxo intracelular	29
4.6 Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Avaliação da citotoxicidade do EH da PVA em HFLS <i>in vitro</i>	31
5.2 Avaliação da atividade antiviral da PVA contra o CHIKV <i>in vitro</i> em HFLS no ensaio de pós-tratamento	32
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae* causador de uma doença de perfil artritogênico transmitida por fêmeas hematófagas de mosquitos do gênero *Aedes* spp. Os pacientes acometidos apresentam na fase aguda da doença sintomas como febre, dores de cabeça, mialgia, rash cutâneo e artralgia, sendo este o sintoma reportado em pouco mais de 90% dos casos (TANABE et al., 2018).

Estudos de interação vírus-hospedeiro são de suma importância para compreensão do mecanismo de infecção e atualmente a literatura já descreve diversos tipos celulares que são susceptíveis à infecção pelo CHIKV: fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e células dendríticas (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). Os sinoviócitos humanos semelhantes a fibroblastos (HFLS) são constituintes da sinóvia, possuem um papel chave em inflamações sinoviais como a artrite reumatoide (AR), através da secreção de fatores inflamatórios que podem recrutar e diferenciar diferentes tipos celulares como monócitos e macrófagos (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; BECHER; TUGUES; GRETER, 2016).

A própolis, material resinoso produzido por abelhas *Apis mellifera*, vem sendo avaliada como promissor antiviral demonstrando atividade contra vírus de herpes bovina e da cinomose canina (GONZÁLEZ-BÚRQUEZ et al., 2018; SIMONI et al., 2018). No território brasileiro há registros de diferentes própolis com atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica (SILVA et al., 2017). A Própolis Vermelha apresenta diversas atividades biológicas como as previamente descritas (BUENO-SILVA et al., 2017; REGUEIRA et al., 2017; RUFATTO et al., 2018; SINOTT et al., 2019) com destaque em atividade antiviral (SILVA-BELTRÁN et al., 2019). Diante do exposto, a hipótese fundamentada é que o extrato hidroalcoólico da PVA possui atividade antiviral contra CHIKV em HFLS *in vitro* e o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antiviral deste material *in vitro* contra o vírus em HFLS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

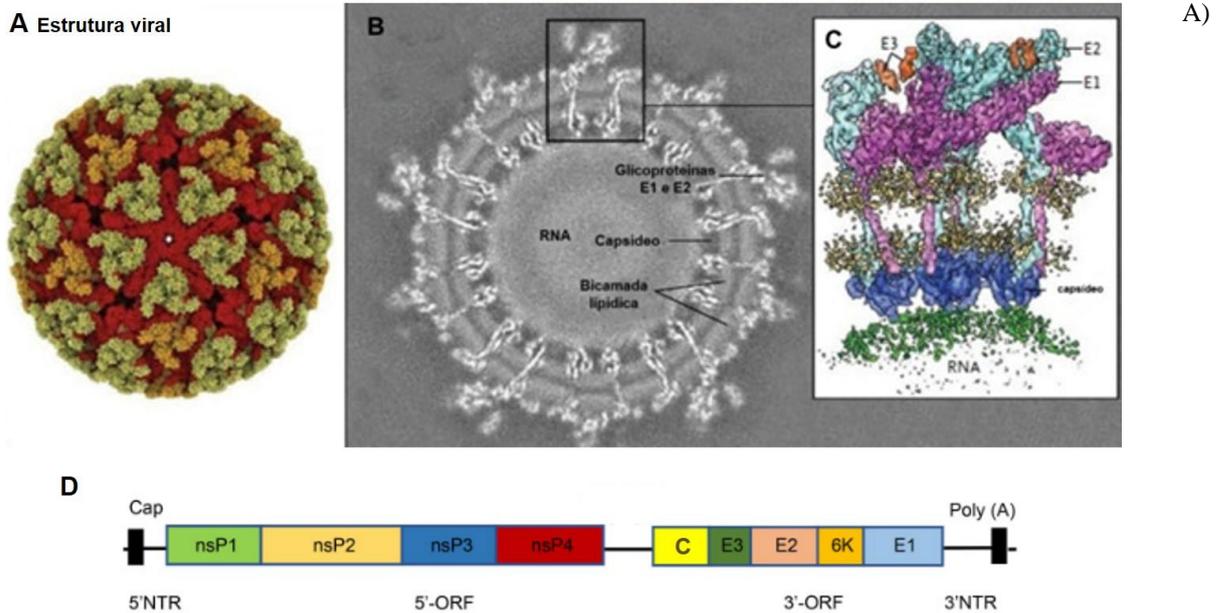
2.1 O vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae* (ICTV, 2019). Os primeiros relatos científicos da doença datam da década de 1950 quando foi detectada uma nova doença endêmica de uma região da atual Tanzânia, país do continente Africano. Pequenas tribos locais da região onde ocorria o surto da doença a nomearam “*Chikungunya*” que no dialeto Makonde significa “aquele que se curva”, remetendo às contorções causadas pelas fortes dores articulares decorrentes da infecção pelo vírus (LUMSDEN, 1955).

O vírus foi isolado pela primeira vez em 1956 após coleta de soro de pacientes na fase aguda da doença (ROSS, 1956). O autor também confirmou que a patologia era causada por uma forma viral ao verificar que mesmo filtradas e tratadas com antibióticos as amostras eram capazes de causar letalidade em animais após inoculação.

O CHIKV é um vírus envelopado de simetria icosaédrica, de RNA fita simples e polaridade positiva, que possui aproximadamente 70 nm (SIMIZU et al., 1984). O genoma viral apresenta cerca de 11,8 kb e, como os demais *Alphavirus*, duas fases de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*) que codificam as suas proteínas estruturais: E1, E2, E3, 6K e C e não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (OKEOMA, 2016). As proteínas estruturais E1 e E2 são glicoproteínas do envelope, estando envolvidas na adesão e fusão do vírus à célula do hospedeiro; E3 e 6K correspondem a peptídeos; e C a proteína do capsídeo. As proteínas não estruturais estão envolvidas no processo de replicação viral (OKEOMA, 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura viral e genoma do CHIKV.

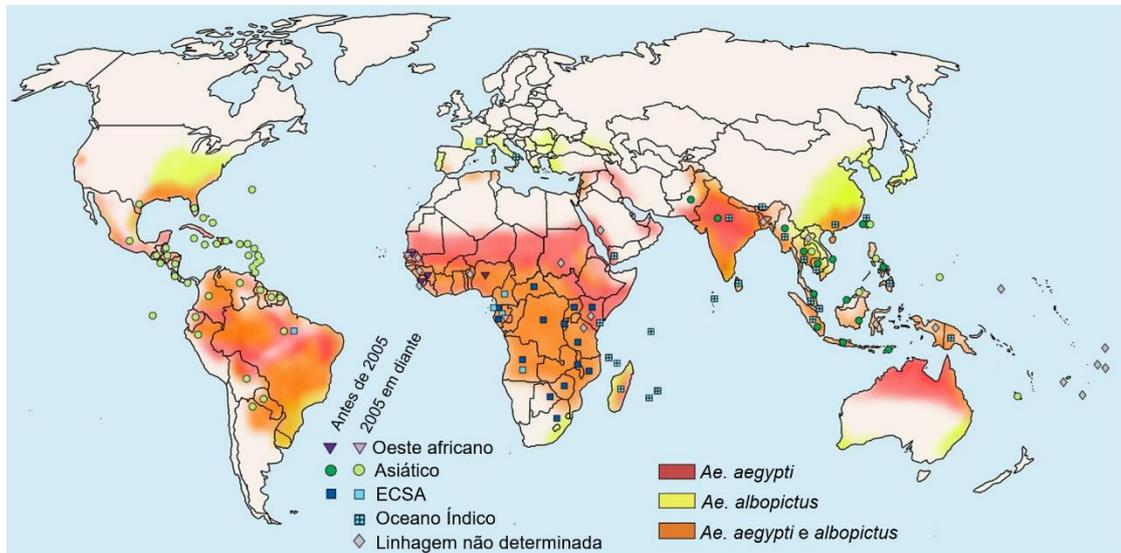


Estrutura do vírus envelopado de simetria icosaédrica. B) Estrutura viral mostrando a localização dos componentes da partícula viral. C) Predição da estrutura proteica constituinte das espículas virais. D) Representação do genoma viral codificante para as proteínas estruturais e não estruturais (Adaptado de AN et al., 2017; WEAVER; LECUIT, 2015).

A disseminação do vírus para diversas regiões do mundo a partir do continente Africano deu origem a diferentes genótipos, primordialmente detectados e nomeados a partir da sua região de incidência: Asiático (*Asian*), Leste/Centro/Sul Africano (ECSA – *East/Central/South-African*), Oeste Africano (*West African*) e o subclado Oceano Índico (IOL – *Indian Ocean Lineage*) (BRAULT et al., 2000; SCHUFFENECKER et al., 2006; VOLK et al., 2010).

A distribuição do vetor *Aedes* spp., nas regiões tropicais e subtropicais, bem como a globalização, migração e turismo são fatores determinantes no surgimento de surtos em diversas localidades. A figura 2 mostra os vetores e genótipos virais circulantes no mundo desde 1952 possibilitando compreender a dispersão desse arbovírus no decorrer dos anos (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição dos vetores transmissores e genótipos circulantes do CHIKV.



A figura evidencia a predominância da circulação do vírus em regiões tropicais e subtropicais de clima apropriado para a presença do vetor *Aedes* sp. (Adaptado de THIBERVILLE et al., 2013).

2.1.2 Ciclo de replicação viral do CHIKV

O mecanismo de replicação viral do CHIKV ainda não foi completamente elucidado, principalmente em relação ao processo de entrada do vírus nas células do hospedeiro. Nos últimos anos, verificou-se a interação entre a glicoproteína do envelope E2 com o receptor celular MXRA8 envolvido no mecanismo de interação vírus/célula hospedeira (WEBER et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

A internalização da partícula viral é mediada por clatrininas através de endocitose ou uma via de endocitose clatrina-independente (HOORNWEG et al., 2016). Neste processo, o endossomo então se torna acidificado devido ao pH citoplasmático e logo há uma indução de dissociação do heterodímero E1-E2 bem como alteração de conformação da proteína E1 que confere a fusão da membrana celular do hospedeiro com o vírus e então o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma celular (BERNARD et al., 2010).

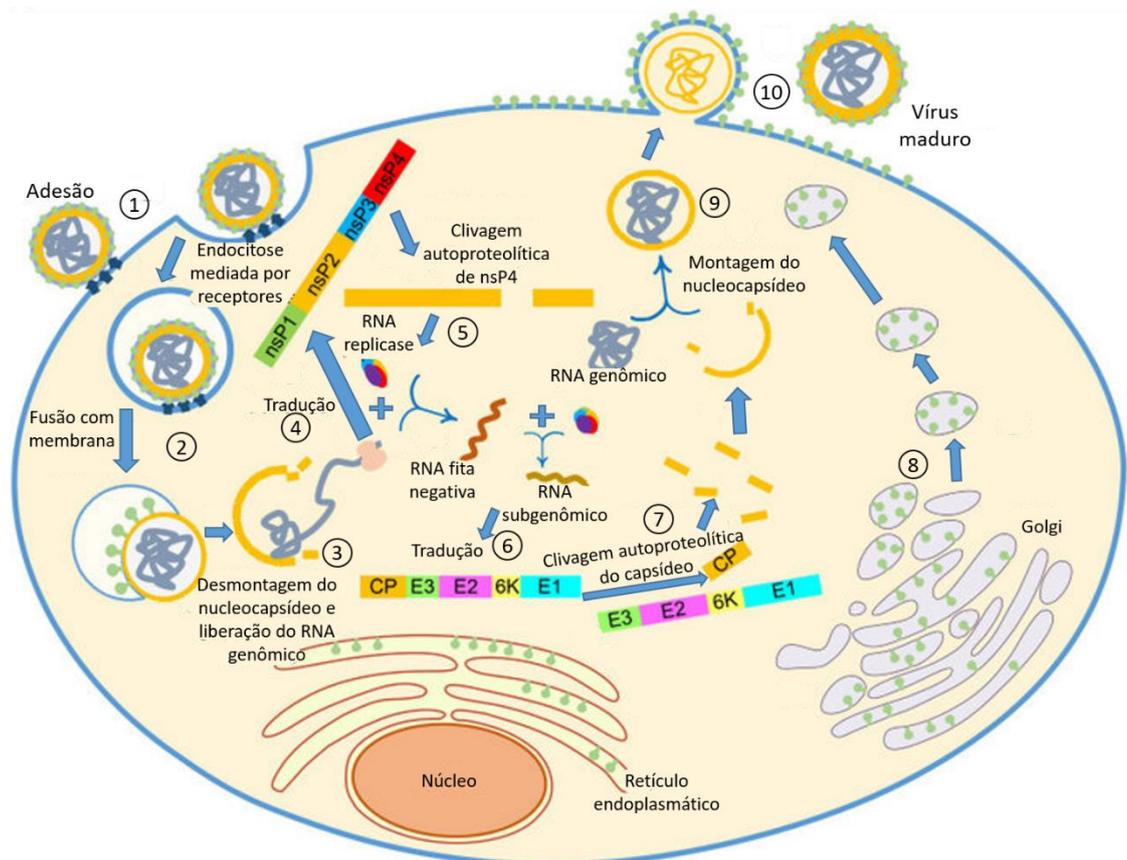
De modo geral, entre os alfavírus, ocorre a liberação do material genético viral proveniente do nucleocapsídeo, seguido do acoplamento ao ribossomo celular (SINGH; HELENIUS, 1992) para a tradução das proteínas não estruturais. Estas proteínas não estruturais quando liberadas no citoplasma desencadeiam o processo de replicação, através da formação

do complexo de replicação para a síntese do RNA senso positivo (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

Uma vez sintetizado o RNA senso positivo, as proteínas estruturais (capsídeo, E2, 6K e E1) podem ser geradas e de forma autoproteolítica são clivadas separando, assim, a proteína do capsídeo da poliproteína pE2-6K-E1, essa poliproteína é então inserida no retículo endoplasmático celular para seu processamento.

Para a síntese do heterodímero E1-E2, a poliproteína precursora pE1-E2 é transportada pela membrana plasmática, passando pelo complexo de Golgi e a clivagem de pE2 é realizada por furina ou protease semelhante à furina. De forma simultânea, a proteína do capsídeo atua com o RNA genômico viral formando assim o nucleocapsídeo, por fim, levado à membrana plasmática, e deixando a célula hospedeira por brotamento, gerando o vírus maduro (AN et al., 2017).

Figura 3 – Ciclo de replicação do vírus Chikungunya.



O ciclo de replicação do CHIKV consiste das seguintes etapas: 1) Adesão viral e interação com receptores celulares mediada pela glicoproteína E2; 2) Internalização por endocitose e fusão entre membranas; 3) Liberação do nucleocapsídeo seguido da desmontagem e liberação do RNA genômico; 4) Tradução das proteínas não-estruturais; 5) Formação de replicase por nsP4 e síntese do RNA senso negativo e seu complementar positivo e RNA subgenômico. 6) Síntese das proteínas estruturais (C-E3-

E2-6K-E1); 7) Clivagem autoproteolítica da proteína do capsídeo e inserção da poliproteína no retículo endoplasmático 8) Passagem da poliproteína por Golgi e membrana plasmática e formação do heterodímero E1-E2 maduro; 9) Interação das proteínas do capsídeo com o RNA genômico e formação do nucleocapsídeo. 10) Os nucleocapsídeos são transportados para a membrana da célula seguido do brotamento e liberação de partículas virais maduras. Fonte: Adaptado de AN et al., 2017.

2.1.3 Chikungunya no Brasil

A presença do vírus no Brasil foi detectada em 2012, a partir de análises sorológicas, no Rio de Janeiro (ALBUQUERQUE et al., 2012), no entanto, o primeiro grande surto da doença veio a ocorrer apenas alguns anos depois, sendo reportados casos de infecção autóctone. Até o fim de 2014 haviam 140 casos confirmados em laboratório e 2.025 por critério clínico-epidemiológico sendo Oiapoque e Feira de Santana os municípios onde foram reportados os primeiros casos autóctones (BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2015).

O pico do número de casos de CHIKV no Brasil ocorreu no ano de 2016, com o registro de 271.824 casos prováveis (Tabela 1) onde, destes, mais de 235.000 casos foram reportados apenas na região nordeste (BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017). Desde então, pesquisas vêm sendo realizadas para sequenciamento de amostras visando determinar quais os genótipos virais circulantes no país, sendo detectados os genótipos ECSA e o asiático (NUNES et al., 2015).

Tabela 1 - Número de casos prováveis de febre Chikungunya, até a Semana Epidemiológica 52, por região e Unidade da Federação, Brasil, 2016. Fonte: Sinan NET (banco de 2015 atualizado em 18/10/2016; e de 2016, em 17/01/2017).

Região/Unidade da Federação	Casos (n)	
	2015	2016
Norte	1.280	8.526
Rondônia	22	804
Acre	10	373
Amazonas	33	885
Roraima	54	237
Pará	265	3.932
Amapá	867	929
Tocantins	29	1.366
Nordeste	36.433	235.136
Maranhão	439	13.507
Piauí	24	2.754
Ceará	87	47.877
Rio Grande do Norte	3.051	24.892
Paraíba	44	19.981
Pernambuco	5.076	48.814
Alagoas	1.388	17.200
Sergipe	2.544	9.231
Bahia	23.780	50.880
Sudeste	495	24.478
Minas Gerais	28	1.431
Espírito Santo	21	456
Rio de Janeiro	83	17.888
São Paulo	363	4.703
Sul	64	1.884
Paraná	28	975
Santa Catarina	17	570
Rio Grande do Sul	19	339
Centro-Oeste	227	1.800
Mato Grosso do Sul	18	274
Mato Grosso	148	558
Goiás	15	393
Distrito Federal	46	575
Total	38.499	271.824

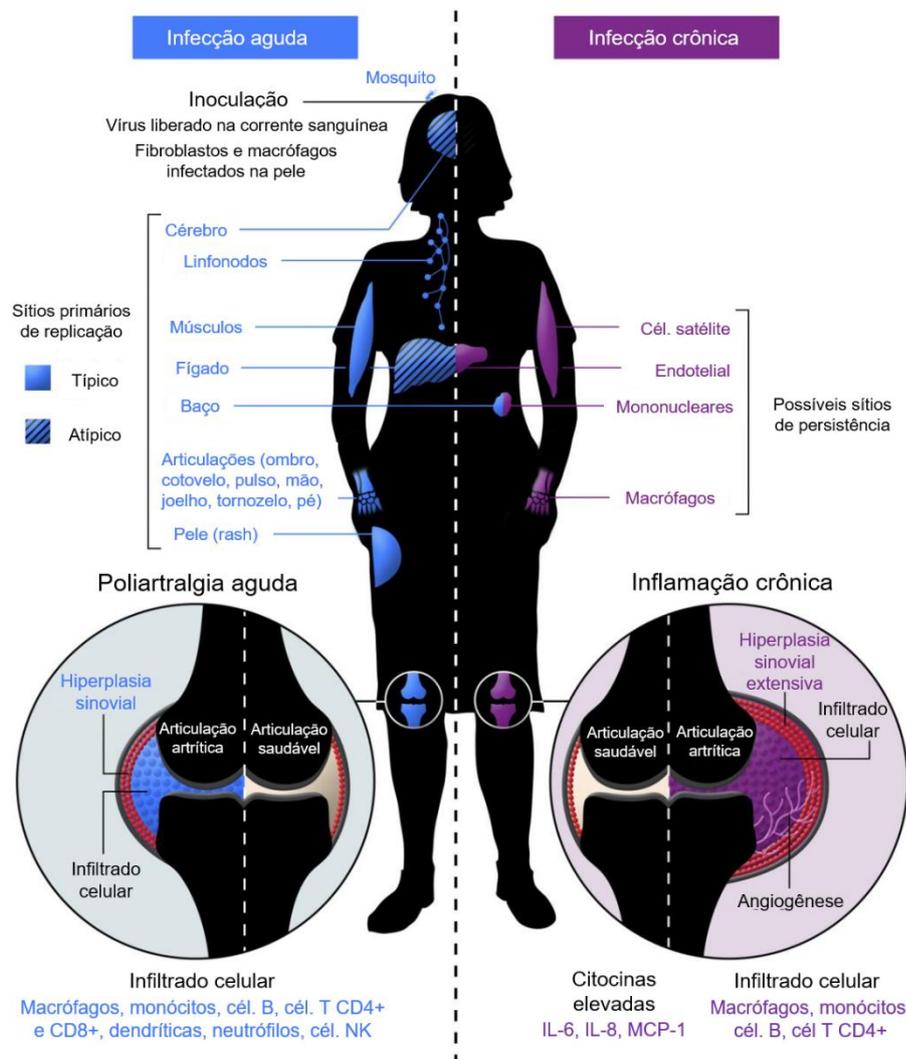
No ano de 2020 foi observado um aumento nos casos prováveis de CHIKV, sugerindo a reemergência do vírus onde até a 24^a semana epidemiológica foram notificados mais de 47.000 casos no país, principalmente na região sudeste seguido da região nordeste (BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2020). O número crescente de casos ressalta a importância da busca por novas intervenções terapêuticas, mas também é um alerta para os órgãos sanitários de saúde e autoridades governamentais para que os cuidados e medidas de prevenção sejam realizados, visando reduzir estes números.

2.2 Interação vírus-hospedeiro

A infecção viral tem início através da picada de fêmeas hematófagas de mosquitos do gênero *Aedes* sp. infectadas e o primeiro contato vírus-hospedeiro ocorre pela infecção de células presentes no local da inoculação, como células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e células dendríticas, podendo resultar na replicação viral local (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012; SOURISSEAU et al., 2007).

Através da microcirculação o vírus migra no corpo do hospedeiro disseminando-se para os linfonodos, baço, tecido muscular e articulações (Figura 4).

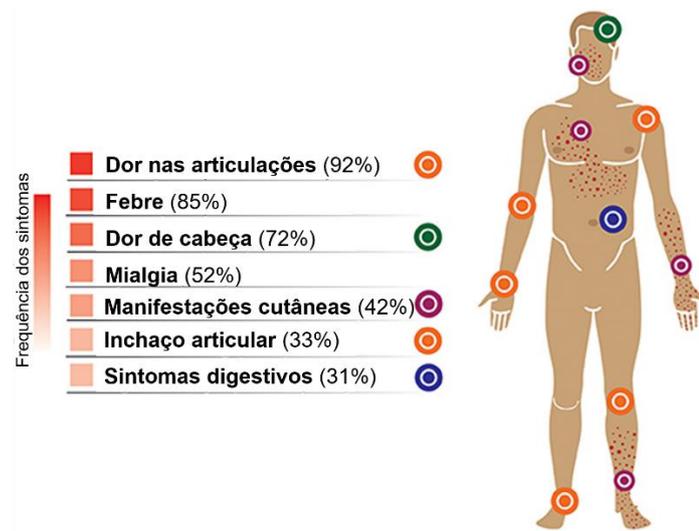
Figura 4 – Sítios de replicação viral nas fases aguda e crônica da FCHIKV.



Representação dos tipos celulares e resposta imune envolvidos na fase aguda e crônica da FCHIKV.
Fonte: Adaptado de SILVA; DERMODY, 2017.

Os sintomas observados na fase aguda da infecção consistem em febre alta, rash cutâneo, dores de cabeça, mialgia, inchaço nas articulações e, em pouco mais de 90% dos casos a artralgia (Figura 5). Em uma parte dos pacientes a doença pode evoluir para uma fase crônica onde a artralgia pode persistir por meses até anos (TANABE et al., 2018), muitas vezes incapacitando a realização atividades diárias.

Figura 5 – Frequência dos sintomas em pacientes acometidos pelo CHIKV na fase aguda.



A sintomatologia da doença se torna bem característica quando avaliado que as dores articulares são observadas na maioria dos casos. Outros aspectos também podem ser observados mas com menor frequência como inchaço nas articulações e alterações digestivas. Fonte: Adaptado de TANABE et al., 2018b.

2.3 HFSL – *Human Fibroblast-like Synoviocytes*

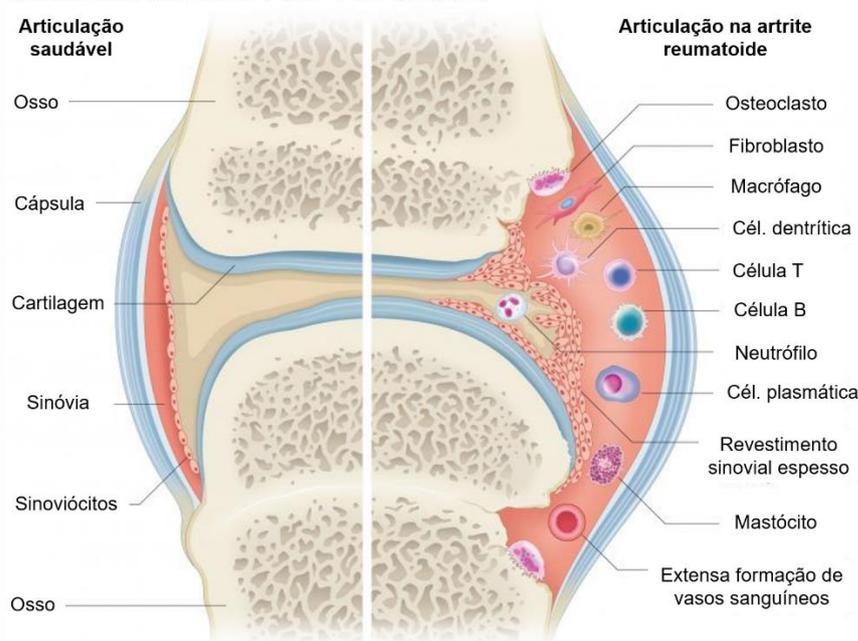
A origem dos sinoviócitos semelhantes a fibroblastos ainda não é totalmente esclarecida, mas avaliações de expressão de receptores proteicos permitem inferir que estas células sejam originadas de células tronco mesenquimais (MARINOVA-MUTAFCHIEVA et al., 2002). Tais células apresentam fenótipo celular fusiforme e alongado e com processos citoplasmáticos, semelhante às células tronco mesenquimais (ROSENGREN; BOYLE; FIRESTEIN, 2007).

Essas células são um dos dois tipos constituintes da membrana sinovial estando envolvidas no processo de lubrificação, manutenção e proteção da cartilagem articular. Os HFSL junto aos sinoviócitos semelhantes a macrófagos, constituem essa delgada camada de células que medeiam o suporte da região, nutrição da cartilagem e também processos inflamatórios em casos patológicos como a artrite reumatoide (BARTOK; FIRESTEIN, 2010).

A produção de quimiocinas também é um fator importante para o recrutamento de células para o sítio de inflamação e angiogênese local. Como exemplo, destaca-se o papel da IL-8/CXL-8 e MCP-1/CCL2 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), considerados biomarcadores que estão elevados em pacientes com artrite reumatoide e na fase crônica da infecção pelo CHIKV (CHAAITHANYA et al., 2011; HOARAU et al., 2010).

O papel desempenhado através da produção e secreção de citocinas e quimiocinas resulta numa hiperplasia sinovial, como consequência da alta proliferação celular e infiltrado de células do sistema imune causando assim o denominado *pannus*, levando a degeneração da matriz cartilaginosa e óssea (Figura 6).

Figura 6 – Esquema representativo de sinóvia saudável e na artrite reumatoide.



A hiperplasia sinovial é evidenciada pelo infiltrado celular composto por células da imunidade inata e adaptativa e osteoclastos atuando na destruição da matriz cartilaginosa e óssea. A angiogênese também pode ser observada, junto aos mediadores químicos secretados por células presentes pode agravar a inflamação local. Fonte: Adaptado por 5W Infographics de SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016.

Citocinas e quimiocinas podem ser avaliadas como marcadores patológicos para compreensão da fisiopatologia da doença, e podendo contribuir para o desenvolvimento de tratamentos específicos. Em um estudo de coorte a presença de biomarcadores em pacientes que apresentaram artralgia persistente meses após infecção pelo CHIKV foi avaliada. Como resultado, foram detectados elevados níveis de IL-6 e GM-CSF no soro de pacientes que apresentaram a sintomatologia crônica da doença, quando comparado a pacientes que sofreram sintomas apenas na fase aguda (CHOW et al., 2011).

2.4 Antivirais

Os antivirais vem sendo estudados há mais de 50 anos e diversos são seus mecanismos de ação envolvidos no tratamento de infecções virais (DE CLERCQ; LI, 2016) (Tabela 2).

Tabela 2 - Grupos de antivirais licenciados (Adaptado de DE CLERCQ; LI, 2016).

Grupos funcionais de drogas antivirais aprovadas	
1	Análogos a 5-substituídos 2'-desoxiuridina
2	Análogos de nucleosídeo
3	Análogos de pirofosfato (não nucleosídeo)
4	Inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeos (RT) (NRTIs)
5	Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (NNRTIs)
6	Inibidores de protease
7	Inibidores de integrase
8	Inibidores de entrada
9	Análogos acíclicos de guanosina
10	Análogos de fosfonato de nucleosídeo acíclico (ANP)
11	Inibidores NS5A e NS5B do vírus da hepatite (HCV)
12	Inibidores do vírus influenza
13	Imunoestimuladores, interferons, oligonucleotídeos e inibidores antimitóticos

Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados na busca por novos agentes contra o CHIKV, dentre estes destacam-se a utilização de anticorpos monoclonais (JIN; SIMMONS, 2019), drogas já existentes como a cloroquina (FRANCO et al., 2018), compostos naturais como baicalina e silimarina (LANI et al., 2015; OO et al., 2018), flavonoides (LANI et al., 2016), bem como moléculas de origem natural (BHAT et al., 2019). Ainda, medicamentos também são utilizados como paliativos, tratando a sintomatologia da fase crônica da doença, como o metotrexato (JAVELLE et al., 2015).

2.5 Própolis

A própolis é uma resina produzida por abelhas *Apis mellifera*, produto do metabolismo de flores, plantas e pólen, constituindo uma mistura de diferentes substâncias (WOISKY; SALATINO, 1998). A composição desse material varia de acordo com a sua origem botânica, sazonalidade e ecologia da região onde foi coletado (ALENCAR et al., 2005) e é caracterizada por apresentar diferentes atividades biológicas (Tabela 3).

Tabela 3 - Diferentes grupos de própolis brasileira e suas propriedades biológicas. Adaptado de FRANCHIN et al., 2018.

Grupo/Estado de origem	Cor da Própolis	Componentes mais abundantes/importantes	Atividade Biológica	Referência
1 (RS)	Amarelo	Tripertenóides	Antioxidante;	PARK, 2000; ITO, 2001.
2 (RS)	Castanho claro	Flavonoides e derivados do ácido cinâmico	Antioxidante;	PARK, 2000.
3 (PR)	Castanho escuro	Principalmente flavonoides (crisina, pinocembrina, pinobanksina e apigenina)	Antimicrobiana; antioxidante; antiinflamatória.	PARK, 2000; ALENCAR, PARK, 2002.
4 (PR)	Castanho claro	Ácido cinâmico e derivados	Antimicrobiana; antioxidante;	PARK, 2000,2002;
5 (PR)	Marrom esverdeado	Flavonoides e derivados do ácido cinâmico	Antimicrobiana; antioxidante; antiinflamatória.	PARK, 2000; ALENCAR, PARK, 2002.
6 (BA)	Marrom avermelhado	Benzofenona prenilada	Antioxidante; antiinflamatória.	PARK, 2000,2002; CASTRO 2009;
7 (BA)	Marrom esverdeado	Flavonoides e derivados do ácido benzoico	Antioxidante; antiinflamatória.	PARK, 2000; ALENCAR, PARK, 2002.
8 (PE)	Castanho escuro	Flavonoides e derivados do ácido benzoico	Antimicrobiana; antioxidante; antiinflamatória.	PARK, 2000; ALENCAR, PARK, 2002
9 (PE)	Amarelo	Derivados do ácido cinâmico	-	PARK, 2000; ALENCAR, PARK, 2002
10 (CE)	Amarelo escuro	Sesquiterpenos	-	PARK, 2000; ALENCAR, PARK, 2002
11 (PI)	Amarelo	Diterpenos	Antioxidante;	PARK, 2000; ALENCAR, PARK, 2002
12 (SP)	Verde/Marrom esverdeado	Ácidos cinâmicos prenilados	Antimicrobiana; antioxidante; antiinflamatória.	PAULINO, 2008
13 (AL, SE e PE)	Vermelha	Principalmente isoflavonoides (formononetina, vestitol, neovestitol, daidzeína) e chalconas	Antimicrobiana; antioxidante;	BUENO-SILVA, 2016; PORTO, 2018.

2.5.1 Própolis Vermelha de Alagoas

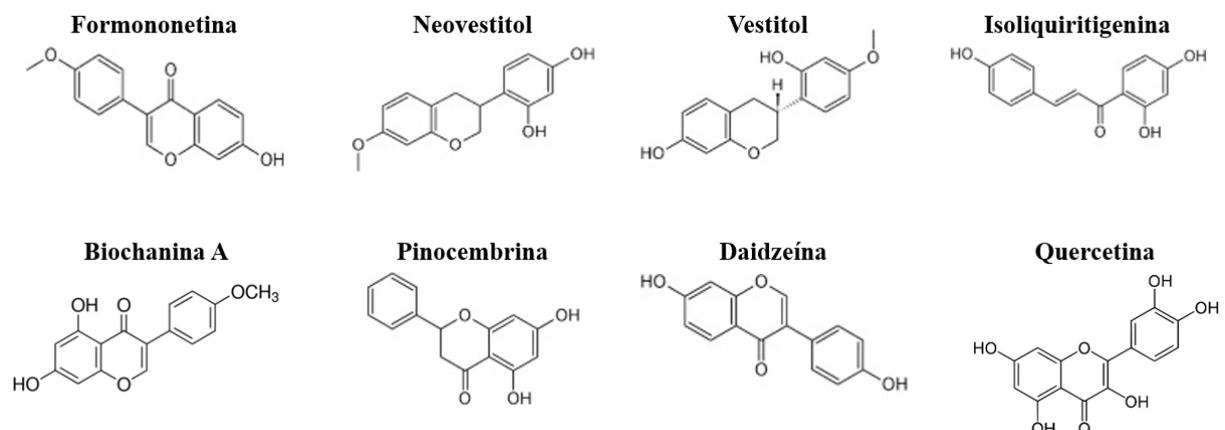
A Própolis Vermelha de Alagoas (PVA) é uma variação de própolis produzida a partir de metabólitos provenientes da planta *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como “rabo-de-bugio”. Sua composição compreende compostos fenólicos como os flavonoides, ésteres e alguns terpenos (SALATINO et al., 2005; SOARES, 2002). Diversas atividades biológicas já foram reportadas para a PVA, destacando-se a atividade antioxidante (BUENO-SILVA et al., 2017), antibacteriana (ORSI et al., 2017), antitumoral (FROZZA et al., 2017), antiviral (SIMONI et al., 2018), dentre outras (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividades biológicas da Própolis Vermelha de Alagoas

Atividade Biológica	Referência
Antiviral	SIMONI et al., 2018, SILVA-BELTRÁN et al., 2019
Antiparasitária	REGUEIRA-NETO et al., 2018; SILVA et al., 2017; SINOTT et al., 2019
Antitumoral	FROZZA et al., 2017
Anti-inflamatória	BUENO-SILVA, BRUNO et al., 2013, 2016
Antioxidativa	BUENO-SILVA, BRUNO et al., 2017
Anti-hipertensiva e redução de dano renal	TELES et al., 2015
Anti-cáries (biofilme)	BUENO-SILVA, B. et al., 2013
Antifúngica	PIPPI et al., 2015

Os compostos químicos presentes na PVA compreendem principalmente flavonoides, o que a diferencia dos demais tipos de própolis brasileiras. Diversos compostos (Figura 7) já foram utilizados em estudos para avaliar diversas atividades biológicas (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016).

Figura 7 - Compostos bioativos presentes na Própolis Vermelha de Alagoas



Componentes da PVA, estas moléculas desempenham diversas atividades biológicas como antiviral, antitumoral dentre outras interações. (Fonte: PubChem. FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016).

Um estudo avaliou a atividade antiviral da formononetina em células de rabdomyosarcoma (RD) contra o enterovírus-71 (EV-71) obtendo uma satisfatória inibição da replicação viral (LI et al., 2017), sendo o mesmo observado em células Vero E6 e de epitélio de neuroblastoma (SK-N-SH) (WANG et al., 2015). Neovestitol e vestitol apresentaram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus* sp, e *Actinomyces naeslundii*, além disso em ensaios de migração de neutrófilos foi observada ação anti-inflamatória desses compostos (BUENO-SILVA et al., 2013a) e ação anti-biofilme demonstrando uma possível aplicabilidade odontológica para tratamento de cáries (BUENO-SILVA et al., 2013b).

A isoliquiritigenina presente na PVA apresentou promissora ação antiviral contra Enterovirus (SILVA-BELTRÁN et al., 2019), além de atividade anti-inflamatória (CORRÊA et al., 2017; FRANCHIN et al., 2018) e antioxidante (ANDRADE et al., 2017).

A pinocembrina apresenta propriedades neuroprotetivas, evitando isquemias e danos cerebrais severos (TAO et al., 2018), além disso também possui atividade anticancerígena em células de ovário (GAO et al., 2019) e uma atividade inibitória da infecção pelo vírus Zika (ZIKV) (LEE et al., 2019). A daidzeína apresenta atividade anti-inflamatória (YU et al., 2020) e junto à quercetina (ZANDI et al., 2011) também possui atividade antiviral. Essa atividade também foi observada contra Herpesvirus, Influenza A e ZIKV (KIM; KIM; SONG, 2020; WONG et al., 2017; WU et al., 2015), além de propriedades antialérgicas (MLCEK et al., 2016).

A biochanina A é uma isoflavona presente na PVA (FROZZA et al., 2017; RUFATTO et al., 2018) que também possui promissoras atividades biológicas descritas como: atividade anticancerígena, através de mecanismos de alterações no ciclo celular (RICE et al., 2002; SEO et al., 2011), indução à apoptose (HSU et al., 2018; LI et al., 2018); anti-inflamatória, mediando a via das MAPK, NF- κ B e a liberação de fatores inflamatórios como TNF- α , iNOS, dentre outros (BASU et al., 2020; ZHANG et al., 2020; ZHANG; CHEN, 2015); e outras atividades como hepatoprotetora, neuroprotetora e antioxidante (SARFRAZ et al., 2020).

É importante compreender a composição química de materiais naturais utilizados em ensaios *in vitro*, assim, podemos determinar seus componentes e avaliar quais possíveis moléculas bioativas apresentam os efeitos observados em ensaios experimentais e assim avaliar se estes compostos atuam de maneira independente ou exigem um sinergismo com outros componentes do extrato em estudo.

Diante do cenário das arboviroses no Brasil e no mundo, é de suma importância que a comunidade científica siga na busca e análises de novas intervenções terapêuticas para a FCHIKV e que os mecanismos de interação deste vírus com células hospedeiras seja elucidado. Assim, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias na prospecção de intervenções terapêuticas frente ao CHIKV.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiviral *in vitro* do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha de Alagoas contra o vírus Chikungunya em sinoviócitos humanos semelhantes a fibroblastos (HFLS).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico (EH) da PVA nos HFLS *in vitro*;
- ✓ Determinar a concentração máxima não tóxica (CMNT) e da CC₅₀ do EH da PVA em HFLS;
- ✓ Avaliar a atividade antiviral do EH da PVA contra o CHIKV em HFLS *in vitro*;
- ✓ Determinar a CI₅₀ e o índice de seletividade (IS) do EH da PVA na infecção de HFLS pelo CHIKV *in vitro*;
- ✓ Detectar a percentagem de células infectadas com o CHIKV após com a PVA por citometria de fluxo intracelular.
- ✓ Avaliar a atividade antiviral da biochanina A, um dos componentes da PVA, contra o CHIKV *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha de Alagoas e preparação da solução de uso

O extrato hidroalcoólico da PVA foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (ICF/UFAL) e então solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido) a uma concentração de 500 mg/mL. A partir dessa solução estoque foi preparada uma solução intermediária do composto em meio DMEM *Low glucose* (10% SFB, 1% PSA e 1% L-Glutamina) na concentração de 10.000 µg/mL para que então as concentrações testadas no ensaio de citotoxicidade e antiviral fossem preparadas.

4.2 Ensaio de citotoxicidade

O cultivo dos HFLS foi previamente padronizado em meio DMEM *Low glucose* (10% SFB, 1% PSA) (FAN et al., 2017). As células foram então submetidas ao ensaio de citotoxicidade para determinação da CMNT (concentração máxima não tóxica) e CC₅₀ (concentração do composto na qual obtém-se 50% de viabilidade celular). Para isso, HFLS foram semeados em placas de 96 poços (2 x 10⁴ células/poço) em triplicatas e após cerca de 24h foram observadas em microscópio óptico invertido para avaliar a confluência da monocamada celular (≈80%). Os poços foram lavados com PBS 1X a 37 °C e então as seguintes variáveis foram adicionadas em triplicatas às monocamadas: controle celular (apenas meio de cultivo); concentrações do extrato hidroalcoólico da PVA: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/ml; Controle veículo DMSO (contendo a concentração de DMSO presente no extrato).

As soluções de uso foram preparadas em meio DMEM *Low glucose* (10% SFB; 1% PSA). Após a adição do composto em suas diferentes concentrações os HFLS foram incubados durante 48h a 37 °C e 5% CO₂, ao fim desse período a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT ([Brometo de (3-(4,5- dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio)]. Foi adicionado 20 µL de MTT (Sigma-Aldrich) por poço, incubado no período de 3h a 37 °C e 5% CO₂ e ao fim o sobrenadante foi removido e adicionado 150 µL DMSO/poço durante 15 minutos para solubilizar os cristais de formazan resultantes da adição de MTT às células. Ao fim do período de incubação a placa foi levada ao espectrofotômetro para leitura das absorbâncias a 490 nm e então ser realizado o cálculo de viabilidade celular através da seguinte fórmula:

$$\% Viabilidade\ celular = \frac{(\text{Absorbância\ cél. tratadas} - \text{Controle\ branco})}{(\text{Absorbância\ média\ do\ controle\ celular} - \text{Controle\ branco})} \times 100$$

O controle branco correspondeu a poços onde estava presente apenas meio de cultivo celular. Após obtenção dos dados de viabilidade celular foi realizada uma análise de regressão não linear para determinação da CC_{50} utilizando o software GraphPad Prism 6. Assim, a obtenção destes resultados possibilitou a determinação da CMNT a ser utilizada no ensaio de atividade antiviral.

4.3 Ensaio antiviral de pós-tratamento

Para avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico da PVA os HFLS foram semeados em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) e infectados com o CHIKV (MOI 0,5) no período de adsorção de 2h com homogeneizações a cada 15 min. Após esse período o sobrenadante foi removido e a monocamada lavada com PBS 1X para remoção das partículas virais não ligantes. Em seguida, as células receberam meio DMEM *Low glucose* (10% SFB, 1% PSA) com o extrato hidroalcoólico da PVA na CMNT desse composto estabelecida no ensaio de citotoxicidade e incubadas a 5% de CO_2 por 48h para que então a viabilidade celular fosse avaliada pela técnica de MTT previamente descrita. A atividade antiviral foi avaliada pela determinação da percentagem de inibição viral calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% Inibição = \frac{(\text{Absorbância\ cél. tratadas} - \text{Controle\ viral})}{(\text{Absorbância\ média\ do\ controle\ celular} - \text{Controle\ viral})} \times 100$$

Todas as absorbâncias foram subtraídas da absorbância do controle branco para então serem aplicadas à fórmula acima.

O índice de seletividade foi determinado a partir da seguinte fórmula:

$$IS = \frac{CC50}{CI50}$$

4.4 Detecção da percentagem de células infectadas por citometria de fluxo intracelular

Para confirmação de atividade antiviral, a análise da percentagem de células infectadas pelo CHIKV *in vitro* foi determinada por citometria de fluxo intracelular sendo a detecção do vírus realizada utilizando-se um anticorpo monoclonal específico para o CHIKV (clone A54Q,

Thermo Scientific). As células, previamente semeadas $3,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 24 poços foram infectadas conforme protocolo preestabelecido, foram fixadas e permeabilizadas utilizando-se os tampões BD *Cytofix/Cytoperm Kit* (BD Biosciences, EUA) conforme recomendações do fabricante.

As células foram então incubadas com o anticorpo primário anti-CHIKV (1:50) por 1h a 4 °C seguido de lavagem com tampão Perm/Wash (BD Biosciences) seguido da incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao Alexa Fluor 488 (1:200) (Molecular Probes) por 1h a 4 °C. Após lavagem, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II. A análise dos resultados foi realizada no software FlowJo para determinação da percentagem de células positivas para infecção viral.

4.5 Avaliação da atividade antiviral da Biochanina A

A biochanina A, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (ICF/UFAL) foi um dos constituintes do extrato hidroalcoólico da PVA escolhidos para avaliação da atividade antiviral. Os ensaios antivirais foram realizados conforme metodologia descrita em 4.3 e 4.4, sendo as concentrações avaliadas: 200, 100, 50, 25 e 12,5 μM nos ensaios de inibição pela técnica de MTT e 200 μM para o ensaio antiviral avaliado por citometria de fluxo intracelular conforme protocolo preestabelecido pelo grupo de pesquisa.

4.6 Análises estatísticas

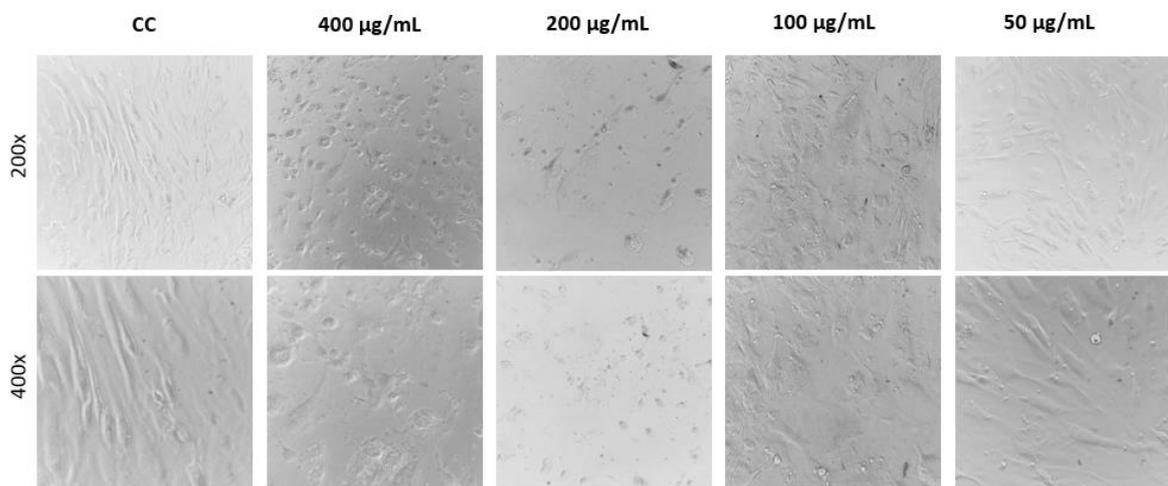
As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6 sendo aplicado o teste t Student ou ANOVA (pós-teste Holm-Sidak) sendo o $p < 0,05$ considerado significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da citotoxicidade do EH da PVA em HFLS *in vitro*

As análises de morfologia celular através de microscopia óptica permitiram visualizar as alterações decorrentes da adição do extrato hidroalcoólico da PVA no meio de cultivo das células. Foi observado que as concentrações de 400 µg/mL e 200 µg/mL foram citotóxicas para os HFLS. Estas maiores concentrações alteraram de forma evidente a morfologia celular para um fenótipo arredondado (Figura 8). Além disso, o desprendimento das células da placa de cultivo foi observado. Na análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT, verificou-se que a concentração máxima não-tóxica (CMNT) foi de 100 µg/mL (Figura 9). A morfologia alongada e fibroblastóide das células nesta concentração é condizente ao fenótipo esperado disponibilizado pelo fornecedor da célula (*Cell Applications, inc.*) e demais autores (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; ROSENGREN; BOYLE; FIRESTEIN, 2007).

Figura 8 - Microscopia óptica de ensaio de citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da PVA em HFLS após 48h.

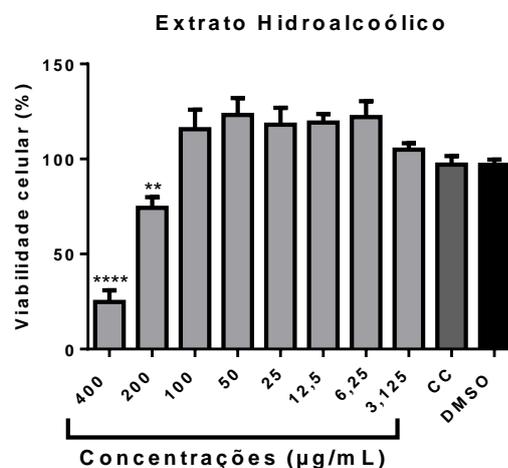


Os HFLS foram semeados em placas de 96 poços e tratados com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da PVA em diluições seriadas no período de 48h. A análise das absorbâncias foi realizada a 490 nm pela técnica de MTT. Alterações morfológicas e morte celular podem ser visualizados nas maiores concentrações, seguido de uma diminuição nas menores concentrações (Magnitudes: 40x, 200x e 400x).

Em posse dos resultados de viabilidade celular do ensaio de citotoxicidade foi analisada a CC_{50} através de uma análise de regressão não linear obtendo-se uma $CC_{50} = 218,5 \mu\text{g/mL}$ corroborando com o observado no gráfico da análise de viabilidade celular, onde a concentração

citotóxica a 50% das células se encontra entre 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9). Em estudo prévio que analisou a citotoxicidade da PVA em células Vero E6 (rim de macaco verde africano) verificou-se que a concentração máxima não tóxica obtida foi de 21,75 $\mu\text{g/mL}$ (RUFATTO et al., 2018). Em outro estudo utilizando estas mesmas células uma CMNT de 125 $\mu\text{g/mL}$ foi detectada (SIMONI et al., 2018). Assim, pode-se inferir, que os HFLS apresentam uma boa tolerância ao extrato hidroalcoólico da PVA *in vitro*.

Figura 9 - Análise estatística da citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha de Alagoas em HFLS *in vitro*.



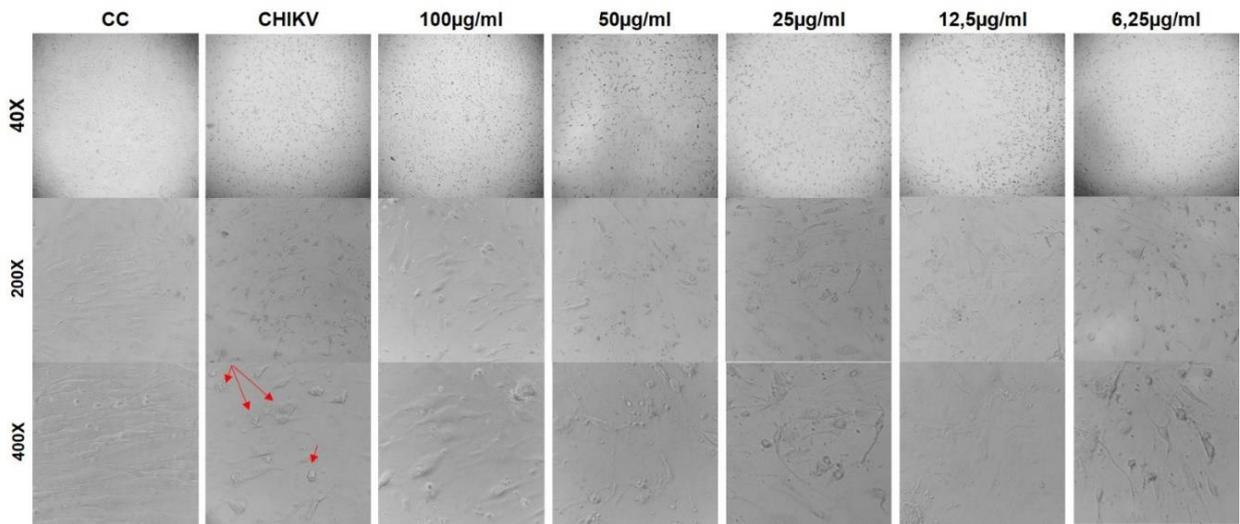
As diferenças de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade foram avaliadas em teste estatístico ANOVA. Dados representativos de dois experimentos independentes ($p \leq 0,0001 = ****$; $p \leq 0,01 = **$. Pós-teste Holm-Sidak).

5.2 Avaliação da atividade antiviral da PVA contra o CHIKV *in vitro* em HFLS no ensaio de pós-tratamento

As evidências científicas mostraram que os HFLS são infectados pelo CHIKV (PHUKLIA et al., 2013; SUKKAEW et al., 2018). Para avaliar a atividade antiviral da PVA, foi utilizado o modelo de infecção de HFLS pelo CHIKV em ensaio de pós-tratamento. Para estes ensaios, o CHIKV foi utilizado em MOI 0,5 levando a uma taxa de 47% de morte celular após 48h no controle celular, visto pelo ensaio de viabilidade celular por MTT. Conforme mostrado na figura 10, a infecção pelo CHIKV nos HFLS levou a um efeito citopático viral evidente, sendo possível observar a presença de prolongamentos citoplasmáticos desordenados, desprendimento da monocamada celular da placa de cultivo e refringência celular.

Ao avaliar a inibição viral, observa-se uma redução de morte celular na concentração de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da PVA (Figura 11). Ainda, um decréscimo gradativo foi detectado ao reduzir a concentração da PVA utilizada mostrando uma atividade *in vitro* dose-dependente.

Figura 10 - Microscopia óptica da atividade antiviral da Própolis Vermelha de Alagoas em fibroblastos sinoviais (HFLS)



Os HFLS, semeados em placas de 96 poços, foram inoculados com CHIKV MOI 0,5 no período de adsorção de 2h e ao término receberam diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da PVA. Microscopia óptica com contraste de fase demonstra o efeito citopático viral indicado por setas no controle viral (CHIKV), pode ser observada redução do efeito citopático nas primeiras concentrações avaliadas. (Magnitude: 40x. 200x e 400x).

Figura 11 - Análise estatística de inibição viral do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha de Alagoas contra o CHIKV em HFLS *in vitro*.

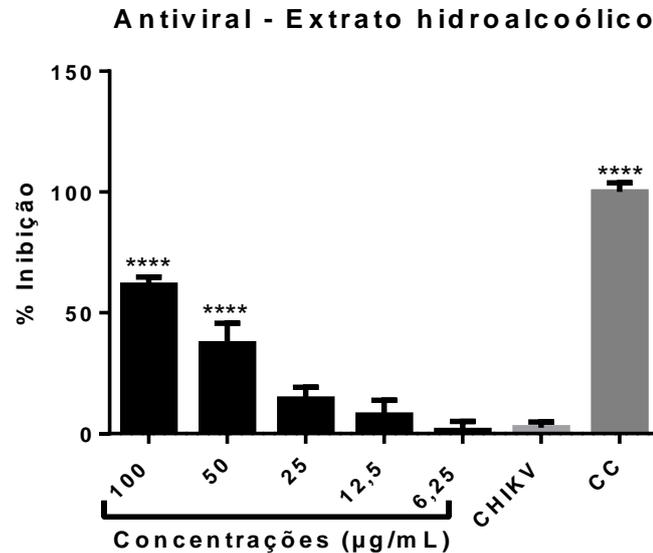


Gráfico representativo da análise estatística utilizando o teste ANOVA múltiplas comparações das triplicatas de dois experimentos independentes (**** $p \leq 0,0001$ em comparação ao controle CHIKV. Pós-teste Holm-Sidak). É possível observar uma inibição viral significativa nas concentrações de 100 e 50 µg/mL., corroborando com a avaliação da alteração morfológica em microscopia óptica.

Embora ainda não tenha estudos publicados mostrando a atividade antiviral da PVA contra o CHIKV na literatura, recentemente, a sua ação antiviral contra o vírus herpes suíno e bovino foi avaliada onde a concentração de 125 µg/mL foi capaz de inibir 87,7% da infecção por estes vírus em células Vero E6 (SIMONI et al., 2018).

A partir dos dados obtidos, foi possível determinar a concentração inibitória viral a 50% das células (CI_{50}) de 51,04 µg/mL e índice de seletividade de 4,28 (Tabela 5). Assim, foi verificado que a PVA exibe uma promissora atividade antiviral contra o CHIKV em HFLS *in vitro*.

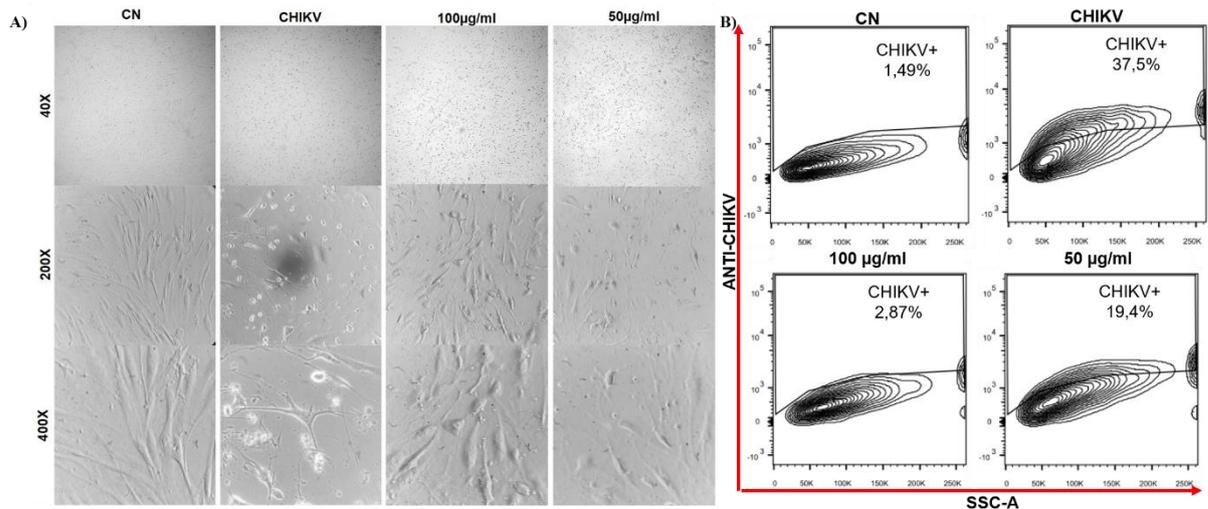
Tabela 5 - Valores de CC_{50} , CI_{50} e índice de seletividade (IS) da PVA.

Extrato Hidroalcoólico da Própolis Vermelha de Alagoas		
CC_{50}	CI_{50}	IS
218,55 µg/mL	51,04 µg/mL	4,28

A análise da porcentagem de células infectadas pelo CHIKV por citometria de fluxo intracelular mostrou uma redução da infecção viral por CHIKV nos HFLS após o tratamento

com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do EH da PVA (Figura 12). A microscopia óptica evidenciou novamente os efeitos causados após 48h de infecção viral e o quanto este efeito é reduzido após o tratamento com o EH, onde as células retomam a sua morfologia padrão de cultivo, semelhantes ao controle celular após o tratamento com a PVA (Figura 12A).

Figura 12 - Detecção da percentagem de células infectadas pelo CHIKV por citometria de fluxo intracelular.



A) Os HFLS foram infectados com o CHIKV MOI 0,5 e tratados com o extrato hidroalcoólico da PVA (100 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Microscopia óptica com contraste de fase demonstra a redução do efeito citopático viral após tratamento com a própolis vermelha de Alagoas (Magnitude: 40, 200 e 400x). B) *Contour-plot* representativo da análise da citometria de fluxo com marcação intracelular para o CHIKV demonstrando redução na percentagem de células infectadas. (CN: controle negativo, meio de cultivo com veículo).

Foi detectada uma significativa redução na percentagem de células positivas para o CHIKV (Figura 13), onde, no controle viral não tratado obteve-se uma média de 48,95% de células infectadas e nas amostras tratadas com a PVA essa porcentagem foi reduzida significativamente para uma média de 5,70%.

Figura 13 - Análise estatística da atividade antiviral da Própolis Vermelha de Alagoas em sinoviócitos humanos semelhantes a fibroblastos (HFLS)

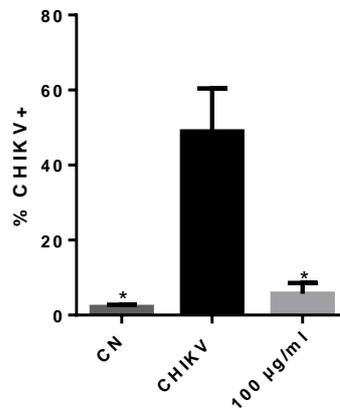
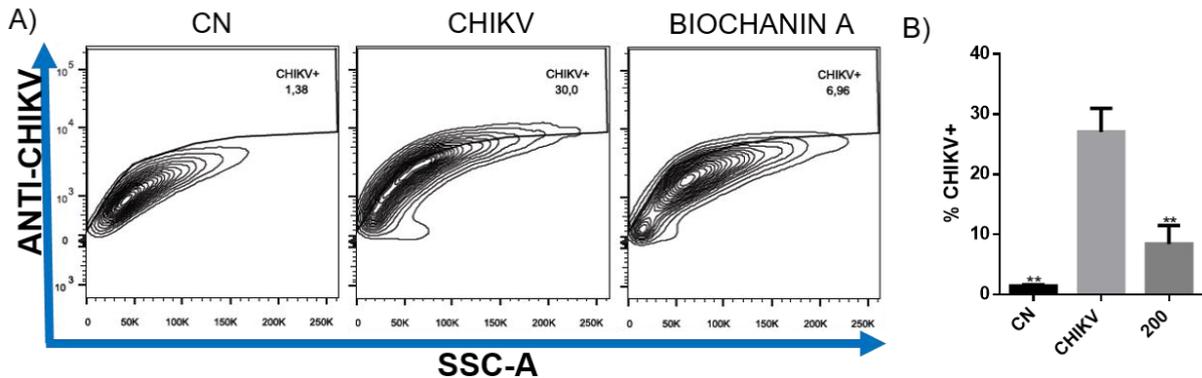


Gráfico representativo da análise realizada em teste ANOVA do experimento realizado em duplicata. O controle tratado com 100 µg/ml apresenta evidente redução da percentagem de células infectadas mostrando a atividade antiviral do produto natural. (* $p < 0,05$, variáveis comparadas ao CHIKV).

Neste estudo, após a confirmação da promissora atividade antiviral do PVA contra o CHIKV em células humanas (HFLS) *in vitro*, avaliou-se a atividade da biochanina A, um dos componentes detectados no extrato por nosso grupo previamente. A biochanina A é um composto presente na PVA que apresenta diversas atividades biológicas (FROZZA et al., 2017; RUFATTO et al., 2018), dentre elas, atividade antiviral contra o vírus Influenza em células A549 (adenocarcinoma pulmonar) (SITHISARN et al., 2013). Um estudo recente avaliou *in silico* a potencial atividade antiviral de flavonoides contra o vírus SARS-CoV-2 e dentre os compostos avaliados a biochanina A apresentou resultados promissores (GORLA et al., 2020). Considerando a diversidade de compostos com propriedades biológicas ativas no EH da PVA, estudos devem ser realizados buscando elucidar se estas moléculas atuam de forma independente ou em sinergismo, assim será possível a elucidação dos mecanismos de atividade antiviral destes componentes.

Assim, resultados preliminares mostraram que o tratamento com biochanina A na concentração de 200 µM reduziu significativamente a percentagem de células infectadas pelo CHIKV *in vitro* em HFLS (Figura 14).

Figura 14 – Citometria de fluxo para análise da infecção viral de HFLS e ação antiviral da biochanina A.



Os HFLS foram infectados com CHIKV (MOI 0,5) e tratados com biochanina A na concentração de 200 μ M. A) *Contour-plot* de análise de citometria de fluxo demonstrando a redução da porcentagem de células infectadas após o tratamento com a biochanina A. B) Análise estatística em teste ANOVA de experimento realizado em triplicata demonstrando significativa redução da porcentagem de células positivas para o CHIKV após o tratamento. ($p \leq 0,01 = **$. Pós-teste Holm-Sidak. CN: controle negativo, meio de cultivo com veículo).

O presente trabalho segue na busca pela compreensão dos mecanismos de infecção viral do CHIKV em HFLS, bem como avaliando os diferentes compostos presentes na PVA e sua atividade antiviral. As próximas etapas consistem na elucidação do possível mecanismo de ação antiviral envolvido e se moléculas isoladas dessa matéria de origem natural podem atuar em sinergismo, contribuindo para a descoberta de novas moléculas bioativas com atividade biológica contra o CHIKV.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, foi detectada uma promissora atividade antiviral do EH da PVA contra o CHIKV em HFLS *in vitro*.

O tratamento com a PVA reduziu a percentagem de HFLS infectados com o CHIKV.

A biochanina A, um dos compostos presentes na PVA, apresentou uma promissora atividade antiviral contra o CHIKV.

Assim, experimentos posteriores serão realizados para avaliar isoladamente a atividade biológica de outros compostos presentes na PVA auxiliando na descoberta de compostos de origem natural com atividade antiviral contra o CHIKV. Além disso, buscaremos elucidar o mecanismo de ação da biochanina A por análises *in silico* e experimentais contribuindo para a descoberta de compostos de origem natural que tenham atividade antiviral contra o CHIKV.

7. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I. G. C. DE et al. Case Report / Relato de Caso Chikungunya virus infection : report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro , Brazil Infecção pelo virus Chikungunya : relato do primeiro caso diagnosticado no Rio de Janeiro , Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 128–129, 2012.
- ALENCAR, S. M. DE et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909–915, ago. 2005.
- AN, W. et al. Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 441–453, 28 dez. 2017.
- ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, n. August, p. 129–138, 2017.
- BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 233, n. 1, p. 233–255, jan. 2010.
- BASU, A. et al. Biochanin A impedes STAT3 activation by upregulating p38 δ MAPK phosphorylation in IL-6-stimulated macrophages. **Inflammation Research**, v. 69, n. 11, p. 1143–1156, 27 nov. 2020.
- BERNARD, E. et al. Endocytosis of Chikungunya Virus into Mammalian Cells: Role of Clathrin and Early Endosomal Compartments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11479, 8 jul. 2010.
- BHAT, S. M. et al. Spectrum of candidate molecules against Chikungunya virus - an insight into the antiviral screening platforms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 4, p. 243–264, 2019.
- BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 52 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 2, p. 1–7, 2015.
- BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 3, p. 1–11, 2017.
- BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2020.
- BRAULT, A. C. 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, 1 fev. 2000.
- 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 2013a.
- 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, 7 nov. 2013b.
- BUENO-SILVA, B. et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity:

Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, n. February, p. 100–107, 2017.

CHAAITHANYA, I. K. et al. Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Chronic Arthropathy in CHIKV Infection. **Viral Immunology**, v. 24, n. 4, p. 265–271, ago. 2011.

CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

CORRÊA, F. R. S. et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 162–171, 2017.

DE CLERCQ, E.; LI, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 695–747, 8 jul. 2016.

FAN, W. et al. Identification of CD4 + T-cell-derived CD161 + CD39 + and CD39 + CD73 + microparticles as new biomarkers for rheumatoid arthritis. **Biomarkers in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 107–116, fev. 2017.

FRANCHIN, M. et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49–55, jun. 2018.

FRANCO, E. J. et al. The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 26, p. 1–7, 2018.

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.

FROZZA, C. O. DA S. et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, n. 2017, p. 951–963, 2017.

GAO, J. et al. Pinocembrin inhibits the proliferation and migration and promotes the apoptosis of ovarian cancer cells through down-regulating the mRNA levels of N-cadherin and GABAB receptor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 120, n. April, p. 109505, dez. 2019.

GORLA, U. S. et al. Lead Finding from Selected Flavonoids with Antiviral (SARS-CoV-2) Potentials against COVID-19: An in-silico Evaluation. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 23, p. 1–12, 2020.

HOARAU, J. J. et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010.

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.

HSU, Y.-N. et al. Anti-proliferative activity of biochanin A in human osteosarcoma cells via mitochondrial-involved apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, n. March 2017, p. 194–204, fev. 2018.

ICTV. **Taxonomy**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>.

- JAVELLE, E. et al. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003603, 11 mar. 2015.
- JIN, J.; SIMMONS, G. Antiviral Functions of Monoclonal Antibodies against Chikungunya Virus. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 305, 28 mar. 2019.
- KIM, C. H.; KIM, J.-E.; SONG, Y.-J. Antiviral Activities of Quercetin and Isoquercitrin Against Human Herpesviruses. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2379, 20 maio 2020.
- KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 325–329, jun. 2012.
- LANI, R. et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.
- LANI, R. et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 133, p. 50–61, 2016.
- LEE, J. LE et al. Antiviral activity of pinocembrin against Zika virus replication. **Antiviral Research**, v. 167, n. April, p. 13–24, jul. 2019.
- LI, G. et al. Characterization of three small molecule inhibitors of enterovirus 71 identified from screening of a library of natural products. **Antiviral Research**, v. 143, p. 85–96, jul. 2017.
- LI, Y. et al. Biochanin A Induces S Phase Arrest and Apoptosis in Lung Cancer Cells. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–12, 3 out. 2018.
- 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, jan. 1955.
- MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L. et al. Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 2, p. 507–513, fev. 2002.
- MLCEK, J. et al. Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 623, 12 maio 2016.
- NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 dez. 2015.
- OKEOMA, C. M. **Chikungunya Virus**. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- OO, A. et al. Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. **Antiviral Research**, v. 150, p. 101–111, fev. 2018.
- ORSI, R. O. et al. Activity of Brazilian propolis against *Aeromonas hydrophila* and its effect on Nile tilapia growth, hematological and non-specific immune response under bacterial infection. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1785–1799, set. 2017.
- PHUKLIA, W. et al. Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. **Virus Research**, v. 177, n. 2, p. 179–188, nov. 2013.
- RICE, L. et al. Mechanisms of the growth inhibitory effects of the isoflavonoid biochanin A on LNCaP cells and xenografts. **The Prostate**, v. 52, n. 3, p. 201–212, 1 ago. 2002.
- ROSENGREN, S.; BOYLE, D. L.; FIRESTEIN, G. S. Acquisition, Culture, and Phenotyping

- of Synovial Fibroblasts. In: **Arthritis Research**. New Jersey: Humana Press, 2007. v. 135p. 365–376.
- 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.
- RUFATTO, L. C. et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, v. 214, n. April, p. 74–82, 2018.
- SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33–38, 2005.
- SARFRAZ, A. et al. Biochanin A: A novel bioactive multifunctional compound from nature. **Science of The Total Environment**, v. 722, p. 137907, jun. 2020.
- SCHUFFENECKER, I. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 23 maio 2006.
- SEO, Y. J. et al. Apoptotic effects of genistein, biochanin-A and apigenin on LNCaP and PC-3 cells by p21 through transcriptional inhibition of polo-like kinase-1. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 11, p. 1489–1494, 2011.
- SILVA-BELTRÁN, N. P. et al. Antiviral effects of Brazilian green and red propolis extracts on Enterovirus surrogates. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019.
- SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017.
- SIMIZU, B. et al. Structural proteins of Chikungunya virus. **Journal of Virology**, v. 51, n. 1, p. 254–258, 1984.
- SIMONI, I. C. et al. In vitro antiviral activity of propolis and Baccharis sp. extracts on animal herpesviruses. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1–7, 27 ago. 2018.
- SINGH, I.; HELENIUS, A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. **Journal of Virology**, v. 66, n. 12, p. 7049–7058, 1992.
- SITHISARN, P. et al. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. **Antiviral Research**, v. 97, n. 1, p. 41–48, jan. 2013.
- SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 2016.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, jan. 2002.
- SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, set. 1994.
- SUKKAEW, A. et al. Heterogeneity of clinical isolates of chikungunya virus and its impact on the responses of primary human fibroblast-like synoviocytes. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 4, p. 525–535, 1 abr. 2018.
- TANABE, I. S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus

- Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. October, p. 345, 2018.
- TAO, J. et al. Neuroprotective effects of pinocembrin on ischemia/reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, n. April, p. 1003–1010, out. 2018.
- THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013.
- 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, H. et al. Formononetin inhibits enterovirus 71 replication by regulating COX-2/PGE2 expression. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 35, 2015.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. 2015.
- WEBER, C. et al. Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005318, 23 jan. 2017.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 24 jan. 1998.
- WONG, G. et al. Antiviral activity of quercetin-3- β -O-D-glucoside against Zika virus infection. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 545–547, 5 dez. 2017.
- WU, W. et al. Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. **Viruses**, v. 8, n. 1, p. 6, 25 dez. 2015.
- YU, Z. et al. Daidzein ameliorates LPS-induced hepatocyte injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 885, n. July, p. 173399, out. 2020.
- ZANDI, K. et al. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 560, 2011.
- ZHANG, R. et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 2018.
- ZHANG, S. et al. Biochanin A alleviates gingival inflammation and alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1–1, 23 out. 2020.
- ZHANG, Y.; CHEN, W. AN. Biochanin A Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokines and Mediators Production in BV2 Microglia. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 1, p. 165–171, 2015.