

DETECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA O ARBOVÍRUS *Mayaro* DE EXTRATO E ISOLADOS DE *Psychotria* sp

Ariane C. Ferraz^{1*}, Thaís de Fátima S. Moraes¹, Lucienir P. Duarte², Sidney A. V. Filho³, José Carlos de Magalhães⁴

1. Estudante de IC da Engenharia de Bioprocessos da UFSJ

2. Pesquisadora do Departamento de Química da UFMG

3. Pesquisador da Escola de Farmácia da UFOP

4. Departamento de Química, Biotec. e Eng. de Bioprocessos da UFSJ / Orientador

Resumo:

A febre Mayaro, causada pelo *Mayaro virus* (MAYV), é uma doença subletal, com sintomas que são confundidos aos de Dengue, Chikungunya, Zika e outras arboviroses. Exceção se faz aos sintomas de poliartralgias e artrites persistentes, que associados ao Mayaro, causam deficiência incapacitante. Não existe, até o momento, vacina ou terapia direcionada ao MAYV, justificando investimentos em pesquisa e prospecção de antivirais. Entre os milhares de espécies de plantas brasileiras com propriedade medicinal, destaca-se *Psychotria* sp para a qual são descritos diversos componentes bioativos. Dessa forma, nesse estudo foram feitas a análise da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) do extrato e de dois isolados da planta, assim como a concentração efetiva, protetiva para 50% (CE₅₀) das células infectadas pelo MAYV. Os compostos mostraram atividade antiviral, com CE₅₀ abaixo de 20 µg/mL e índice de seletividade acima de 1, indicando ação direcionada ao vírus e não à célula hospedeira.

Autorização legal: O uso dessa planta em rituais religiosos foi reconhecido como legítimo pelo Conselho Nacional de Políticas de Drogas (CONAD), através da Resolução nº 1, de 25 de janeiro de 2010 (D.O.U. 2010). A utilização na pesquisa foi autorizada pela Polícia Federal. Informação obtida junto ao NEPLAM/UFMG.

Palavras-chave: *Mayaro virus*; antiviral; *Psychotria* sp.

Apoio financeiro: Fapemig

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Universidade Federal de São João del-Rei

Introdução:

O vírus Mayaro (MAYV), pertencente à Família Togoviridae e gênero *Alphavirus*, é também conhecido como membro do grupo dos Arbovírus (*Arthropod-borne virus*), o qual engloba todos os vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, com outros exemplos relevantes, entre eles, o vírus da encefalite, da Dengue, da Febre amarela, da Meningite, da Zika e Chikungunya (Coimbra *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2015).

O ciclo de manutenção de *Mayaro virus* na natureza é enzoótico e análogo ao ciclo do vírus da febre amarela (YFV). Durante o ciclo silvestre, artrópodes podem transmitir o vírus a primatas não humanos e outros mamíferos de vida livre (Forshey *et al.*, 2010). O principal vetor é o mosquito *Haemagogus janthinomys*, de hábito diurno e encontrado em copas de árvores. Entretanto, o envolvimento de vetores secundários, como mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*, e também outros hospedeiros, como pássaros e roedores são importantes potenciais meios de propagação do MAYV (Muñoz e Navarro, 2012; Napoleão-Pego *et al.*, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde (2015), no Brasil, no período de dezembro/2014 a janeiro/2016, foram notificados 343 casos suspeitos de infecção em humanos por MAYV, distribuídos em onze estados da região Norte, Nordeste e Centro-Oeste, sendo Goiás o estado com 53% das ocorrências. Dos casos registrados, 70 foram confirmados, 29 descartados e 244 ainda se encontravam em análise.

Apesar de não haver relatos de morte associada à infecção por MAYV, e esta ser uma arbovirose menos grave que a Dengue, a febre Mayaro é doença altamente debilitante, na qual artralgias graves podem persistir por meses após infecção, acarretando em perda de produtividade (Theilacker *et al.*, 2013; Sleger *et al.*, 2014).

Considerando o número de visitantes nos trópicos, a rapidez do transporte aéreo e a possível disseminação do vírus para outros

locais, além da inexistência de terapia ou vacina, o desenvolvimento de fármacos contra a febre Mayaro se faz necessário. Ainda, com a emergência e re-emergência dos arbovírus, durante a infecção de diferentes organismos o vírus pode ser selecionado pelo hospedeiro, produzindo cepas mais virulentas ou mais adaptadas. Em função desses fatores e pela carência de estudos investigando a presença de atividade antiviral no gênero *Psychotria*, e nenhum avaliando a atividade contra MAYV, o presente estudo teve como objetivo efetuar a prospecção da atividade antiviral em extrato e compostos isolados, a partir da *Psychotria* sp, contra o vírus Mayaro.

Metodologia:

Os compostos candidatos a antivirais foram obtidos por meio de extração metanólica de folhas de *Psychotria* sp e cedidos pelo grupo de pesquisa Neplam/UFMG, sendo a concentração estoque igual a 50 mg/mL.

Duas linhagens contínuas de células foram cultivadas para que os ensaios pudessem ser realizados. As células de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, C6/36, foram mantidas em temperatura ambiente, meio L-15 contendo 5% de SFB e um coquetel de antibióticos, sendo repicadas semanalmente. Já as células de mamífero, BHK-21, são fibroblastos derivados de rim *Mesocricetus auratus* e foram mantidas em meio DMEM com 5% de SFB, juntamente com os antibióticos usuais, sendo repicadas em intervalos de 3,5 dias e mantidas a 37°C, em estufa de CO₂.

O vírus Mayaro, cepa BeAr 20290 (Cedido pelo Prof. Dr. Maurício Nogueira/FAMERP/SP), foi multiplicado em células VERO (Rim de Macaco Verde), a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 vírus por célula. Após 48 horas de infecção, e com 90% de efeito citopático (ECP), o sobrenadante das culturas foi transferido para tubos, centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 5 min e, aliquoteado e mantido em freezer a -80°C. O título do estoque de vírus foi expresso em número de unidades formadoras de placas (UFP)/mL, utilizando-se as células de mamífero, BHK-21, as quais foram também utilizadas para os ensaios antivirais.

Para determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀), as culturas celulares foram implantadas em microplacas de 96 poços (2x10⁵ células/100 µL/poço) e incubadas a 37°C por 24h, sobre as quais foram adicionadas diferentes concentrações dos compostos.

A revelação foi feita pelo ensaio

colorimétrico com MTT (metil-tiazol-tetrazólio) e as absorbâncias, em cada poço, foram medidas em espectrofotômetro de ELISA a 492nm. A toxicidade celular foi expressa em termos CC₅₀ e a porcentagem de células viáveis foi calculada como $[(B*100)/A]$, sendo A e B as absorbâncias das cavidades com células não tratadas (A) e células tratadas (B), respectivamente.

Para o ensaio antiviral global, foram preparadas microplacas de 96 poços, sendo que as células implantadas e pré-tratadas com diluições dos compostos candidatos a antiviral por 30 min antes da adição do vírus (também pré-tratado com os compostos). Após 48h de infecção, fez-se a revelação pelo ensaio com MTT. A concentração efetiva, protetiva para 50% das células infectadas (CE₅₀) foi calculada pela equação $[(A-B)/(C-B)] \times 100$, sendo que A, B, C representam a densidade óptica (492nm) das cavidades nas quais estão presentes células tratadas e infectadas (A), não tratadas e infectadas (B) e não tratadas e não infectadas (C), respectivamente.

Resultados e Discussão:

O ensaio de citotoxicidade foi realizado, utilizando-se células BHK-21 e C6/36, sendo a citotoxicidade *in vitro* empregada para definir apenas efeito tóxico basal, em que a substância provoca danos nas funções básicas da célula, levando-a a morte. Para melhor visualização dos resultados, o gráfico da figura 1 apresenta a comparação entre os valores de citotoxicidade dos compostos em ambas as linhagens empregadas no estudo.

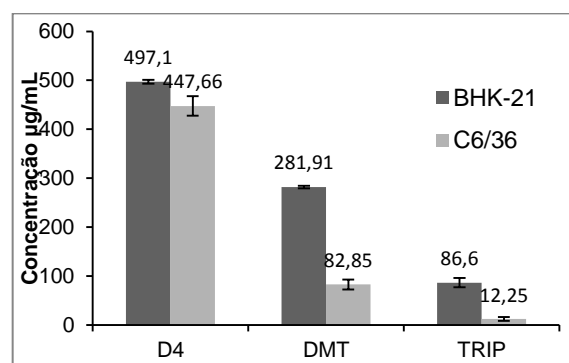


Figura 1: Valores obtidos de CC₅₀ para o extrato metanólico (D4) e os isolados DMX e TRIX, empregando-se a linhagem de células de mamífero BHK-21 e células de mosquito C6/36, respectivamente.

O ensaio antiviral foi realizado, utilizando-se as células de mamífero BHK-21 e, após 48h da adição dos compostos e da suspensão viral, pode-se notar que para os três compostos teste a viabilidade celular das

células tratadas e infectadas estava maior que a viabilidade das células apenas infectadas pelo vírus Mayaro. Houve redução significativa do efeito citopático viral (ECP), principalmente nas células que foram tratadas com os isolados de D4. Sendo assim, o resultado de CE_{50} foi igual a $18,23 \pm 3,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato D4, $9,16 \pm 7,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DMX e $16,36 \pm 1,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ TRIX, estes valores foram obtidos pelas médias das triplicatas realizadas.

Os valores obtidos de CE_{50} foram bem menores que os encontrados de CC_{50} , em todos os casos, ou seja, a concentração ativa dos compostos candidatos é bem menor que a concentração necessária para matar as células por efeitos citotóxicos. Desse modo, o Índice de Seletividade (IS), razão entre CC_{50} e CE_{50} , do extrato D4 e os dois isolados foram maior que 1, indicando que a bioatividade apresentada por estes não é consequência dos efeitos tóxicos gerais dos constituintes que estão presentes do extrato/isolado, e que eles são seletivos para o vírus em questão.

Conclusões:

Os compostos testados de *Psychotria* sp se mostraram eficazes contra MAYV a uma MOI de 0,01, sendo a concentração efetiva (CE_{50}) igual a $18,23 \pm 3,72$; $9,16 \pm 7,43$ e $16,36 \pm 1,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ para D4, DMX e TRIX. O Índice de Seletividade (IS) foi maior que 1, conforme recomenda a literatura, mostrando que a dose ativa é segura para as células, uma vez que janela entre dose efetiva e dose tóxica foi bem grande em todos os casos.

Como os resultados foram promissores, estudos serão conduzidos em nosso laboratório no sentido de elucidar possíveis ações sinérgicas entre os compostos, o efeito virucida, além de tentar encontrar os possíveis mecanismos de ação antiviral.

Referências bibliográficas

- BERETZ, A.; ROTH-GEORGER, A.; CORRE, G.; KUBALLA, B.; ANTON, R.; CAZENAVE, J. **Polyindolinic alkaloids from *Psychotria forsteriana*. Potent inhibitors of the aggregation of human platelets.** *PlantaMed.*, 51, 300-303, 1985.
- COIMBRA, T.L., *et al.* **Mayaro virus: imported cases of human infection in Sao Paulo State, Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 49, p. 221–224, 2007.
- EISEMBRAND, G. *et al.* **Method of *in vitro* toxicology.** *Food and Chemical Toxicology*, v.40, n.1, p.193-236, 2002.
- FORSHEY, Brett M.; GUEVARA, Carolina; LAGUNA-TORRES, V. Alberto; CESPEDES, Manuel *et al.* **Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western South America, 2000 – 2007.** *PLos Neglected Tropical Disease*, v.4, n.8, e787, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – Portal da Saúde. **Febre Mayaro.** Novembro, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/febredo-mayaro>>. Acesso em 14 de março de 2017.
- MOKOKA, T. A., *et al.* **Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae).** *BioMed Central: Complementary and Alternative Medicine*, 13: 111, 2013.
- MUNÓZ, Manuel; NAVARRO, Juan Carlos. **Virus Mayaro: um arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica.** *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, v.32, p. 286-302, 2012.
- NAPOLEÃO-PEGO, Paloma; GOMES, Luciano P.; PROVANCE-JR, David W.; DE-SIMONE, Salvatore G. **Mayaro virus Disease.** *Journal of Human Virology*, v.1, n.3, p.1-11, 2014.
- SLEGER, C. A.; KEUTER, M.; GÜNTHER, S.; SCHMIDT-CHANASIT, J. *et al.* **Persisting arthralgia due to *Mayaro virus* infection in a traveler from Brazil: is there a risk for attendants to the 2014 FIFA world cup?** *Journal of Clinical Virology*, v.60, n.3, p. 317-319, 2014
- THEILACKER, Christian; HELD, Jürgen; ALLERING, Ludger; EMMERICH, Petra *et al.* **Prolonged polyarthralgia in a German traveller with *Mayaro virus* infection without inflammatory correlates.** *BioMed Central Infectious Disease*, v.13, p.369-373, 2013.
- VIEIRA, C. J. D. S. P., *et al.* **Detection of *Mayaro virus* infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil.** *ActaTropica*, v. 147, p.12–16, 2015.