

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade de alcalóides sintéticos no ciclo replicativo do zikv e chikv *in vitro*.

Daniel Oliveira Silva Martins

Monografia apresentada à
coordenação do curso de
Biotecnologia, na Universidade
Federal de Uberlândia, como parte
dos requisitos para obter o título
de bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Outubro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade de alcalóides sintéticos no ciclo replicativo do zikv e chikv *in vitro*.

Daniel Oliveira Silva Martins

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

Co-orientador (a): Msc. Jacqueline Farinha Shimizu

Monografia apresentada à
coordenação do curso de
Biotecnologia, na Universidade
Federal de Uberlândia, como parte
dos requisitos para obter o título
de bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Outubro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade de alcalóides sintéticos no ciclo replicativo do Zikv e Chikv *in vitro*.

Daniel Oliveira Silva Martins

Ana Carolina Gomes Jardim

Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM - UFU)

Jacqueline Farinha Shimizu

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE - UNESP)

Homologado pela coordenação do
Curso de Biotecnologia em
// _____.

Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Outubro – 2017

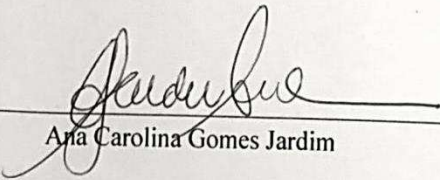
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade de alcalóides sintéticos no ciclo replicativo do ZIKV e CHIKV *in vitro*.

Daniel Oliveira Silva Martins

Aprovado pela Banca Examinadora em 11 / 10 / 2017

Nota: 99


Ana Carolina Gomes Jardim

Uberlândia, 11 de outubro de 2017.

LISTA DE ABREVIATURAS

μF – micro Faraday

μg – microgramas

μL – microlitros

μM – Micromolar

CDC – *Center for disease control and prevention* (Centro de controle e prevenção de doenças)

CHIKV – Chikungunya vírus

CMC – Carboximetilcelulose

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EGFP – *Green fluoresce protein* (Proteína de fluorescência verde)

FBS – *Fetal bovine serum* (Soro fetal bovino)

Kb – Kilobase

LB – Meio Luria-Bertani

MOI – *Multiplicity of infection*

MTT – 1.3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

ng - nanogramas

PAC – Puromicina N-acetiltransferase (*Puromycin N-acetyltransferase*)

PBS – Tampão fosfato salino

v/v – volume/volume

ZIKV – Zikavírus

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a todos da minha família por todo suporte durante minha graduação. Em especial aos meus pais, Victor e Patrícia, minha avó materna, Cidalina, que tanto me apóia e ensina desde meus primeiros dias de vida e minha irmã, Danielle.

Agradeço também aos meus mestres por todo conhecimento cedido de bom grado com o intuito único de ensinar. Minha orientadora, Carol, por todo estímulo e apoio científico, por sempre ter honrado seus compromissos e tratando nossa relação orientando e orientador com muito respeito, dedicação e carinho.

Agradeço aos meus colegas de sala e amigos, com quem dividi maior parte do meu tempo nos últimos quatro anos. Sem o suporte e alegria destes, seria impossível aprender tudo que aprendi durante todos esses anos. Agradeço em especial Isadora, Karen, Ana Luiza, Marília, Mônica e Kássio com quem mais convivi, aprendi e troquei experiências.

Agradeço a todos os parceiros e amigos do Laboratório de Virologia por todo suporte e momentos que passamos juntos desde o início da minha Iniciação Científica. Agradeço em especial à Suely, Débora e Jacqueline pó muito me terem ensinado e permitido que compartilhasse com elas meus conhecimentos.

Resumo

O vírus chikungunya (CHIKV) e o vírus Zika (ZIKV) são arboviroses transmitidas pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*. Nos últimos anos houve um aumento no número de pessoas infectadas por estes vírus e no número de países que notificaram casos de Febre Chikungunya e Febre Zika. Ainda não há disponível no mercado vacinas ou antivirais para tratamento dos pacientes infectados com tais vírus, existindo a necessidade do estudo de moléculas com potencial atividade contra essas arboviroses. Este trabalho avaliou a atividade antiviral 9 alcalóides sintéticos na replicação do CHIKV, em linhagem celular com replicon subgenômico, que expressava proteínas não estruturais do CHIKV e *reporters* Renilla e EGFP. Além disso, também analisou a atividade antiviral destes compostos sintéticos contra a infecção do ZIKV, a partir de partículas virais com *repórters* Renilla. Os resultados demonstraram que o alcalóide Fac 2 inibiu 75,55 % da replicação do CHIKV, e não apresentou qualquer citotoxicidade as células tratadas. Os alcalóides sintéticos Fac 7, 16 e 20 inibiram 48, 46 e 35 % da Infectividade do ZIKV *in vitro*. Os resultados são promissores e demonstram que alcalóides sintéticos se apresentam como potenciais candidatos no tratamento antiviral das Febre Chikungunya e ZIKA.

Palavras chave: Arbovirose; Chikungunya; Zika; Antiviral; Alcalóide; Sintético.

Abstract

Chikungunya (CHIKV) virus and Zika (ZIKV) are arboviruses transmitted by the bite of female mosquitoes of *Aedes* genus. In the last years has been an increase in the number of infected people by these viruses and the number of countries that notified cases of Chikungunya and Zika fever. There is not yet available vaccine or antiviral to treat patients infected with these viruses, there is the need of the study of molecules with potential antiviral activity against Arboviruses. This study evaluated the antiviral activity of 9 synthetic alkaloids in replication of CHIKV in cell line expressing subgenomic replicon, which expressed non-structural proteins of CHIKV and reporters Renilla and EGFP. In addition, also evaluated the antiviral activity of these synthetic compounds against ZIKV infection with viral particles with reporter Renilla. The results showed that the alkaloid Fac 2 inhibited 75.55 % of CHIKV replication, and did not show cytotoxicity to the treated cells. The synthetic alkaloids Fac 7, 16 e 20 inhibited 48, 46 e 35% of ZIKV infectivity *in vitro*. The results show that synthetic alkaloids are potential candidates to treat Chikungunya and Zika fever.

Key-words : Arboviruses; Chikungunya; Zika; Antiviral; Alkaloid; Synthetic.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Chikungunya vírus.....	1
1.2. Zika vírus.....	5
1.3. Compostos naturais como antivirais.....	8
2. Objetivo Geral.....	10
2.1. Objetivos específicos.....	10
3. Material e Métodos.....	11
3.1. Compostos.....	11
3.2. Replicon subgenômico de CHIKV.....	11
3.3. Preparação do replicon CHIKV para transfecção das células.....	11
3.4. Cultura de Células.....	12
3.5. Linhagem celular estável.....	12
3.6. Produção de partículas de Zika.....	13
3.7. Ensaio de placa.....	13
3.8. Ensaio MTT de citotoxicidade.....	14
3.9. Ensaio antiviral em replicon subgenômico(CHIKV).....	15
3.10. Ensaio antiviral em vírus completo(ZIKV).....	15
4. Resultados.....	16
4.1. Estabelecimento da linhagem estável Huh7-CHIKV RLUCFL-5A-PG.....	16
4.2. Ensaio de viabilidade.....	17
4.3. Ensaio de placa.....	20
4.4. Replicação do CHIKV.....	20
4.5. Infecção ZIKV-Nanoluc.....	22
5. Discussão.....	24
6. Referências bibliográficas.....	26

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, arboviroses são doenças causadas por vírus que são mantidos na natureza e transmitidos entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e por meio de artrópodes hematófagos (CUMAKOV et al., 1967).

Um dos principais vetores artrópodes são os mosquitos do gênero *Aedes* que transmitem os vírus Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) e Dengue (DENV), dentre outros (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* desenvolvem todo seu ciclo de vida em áreas próximas aos humanos e dessa maneira passaram a se alimentar de sangue humano, mesmo existindo a presença de outros mamíferos nas proximidades. Portanto, se tornaram um vetor de patógenos que utilizam o mosquito como uma ponte para o hospedeiro final (DELATTE et al., 2010; KAMGANG et al., 2012; PONLAWAT et al., 2005). Kraemer e colaboradores demonstraram que o mosquito também se adapta a diferentes regiões climáticas, o que aumenta sua ocupação geográfica e consequentemente a possibilidade de transmissão de arboviroses para humanos (KRAEMER et al., 2015; MORENS; FAUCI, 2014).

Nos últimos anos, diversos surtos relacionados à arboviroses vêm ocorrendo em todo o mundo (GYAWALI; BRADBURY; TAYLOR-ROBINSON, 2016; KYLE; HARRIS, 2008; WEAVER; LECUIT, 2015). O crescimento destes surtos tem sido motivo de preocupação para órgãos governamentais e pesquisadores. Tal preocupação vem fomentando diversas pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de antivirais específicos e agentes imunizantes contra arboviroses (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016), principalmente contra o CHIKV e ZIKV, responsáveis por grandes surtos que atingiram diversos países, com grande importância política e econômica (AMRAOUI; FAILLOUX, 2016; FELDSTEIN et al., 2016; FELLNER, 2016; LINDSEY et al., 2015; MARINI et al., 2017; NASCI, 2014).

1.1. Chikungunya vírus

O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence à família *Togaviridae* e o gênero *Alphavirus*, com tamanho aproximado de 60-70 nm. É um vírus com envelope, derivado das membranas das células do hospedeiro, onde estão inseridas as proteínas estruturais E1 e E2; possui capsídeo icosaédrico e genoma de fita de RNA simples e polaridade positiva com aproximadamente 12 kb (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; KHAN et al., 2002;

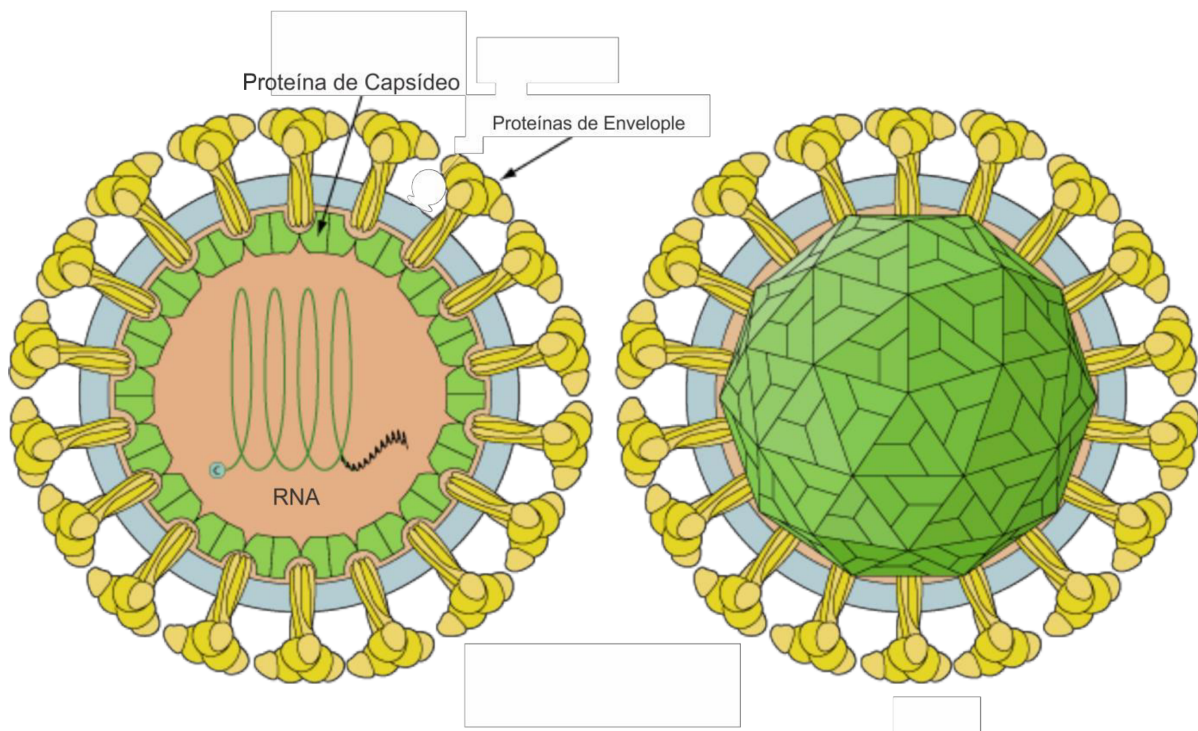


Figura 1. Ilustração da organização estrutural de *Alphavirus*. Adaptado de Instituto de Bioinformática da Suíça (*Swiss Institute of Bioinformatics*) Fonte: (http://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species)

CHIKV é transmitido principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*. Entretanto, um estudo de Tsetsarkin e colaboradores (2011) demonstrou que uma mutação pontual na proteína do envelope E1 promoveu a adaptação do vírus em mosquitos *Aedes albopictus*, que passou a transmitir o vírus para hospedeiros humanos (TSETSARKIN; WEAVER, 2011). A infecção pelo CHIKV se caracteriza por um período de incubação que varia de 1 a 12 dias (SINGH; UNNI, 2011). Após esse período, os pacientes infectados podem apresentar sintomas clínicos como febres severas e dores incapacitantes, principalmente nas articulações. As manifestações clínicas da presença do vírus são denominadas Febre Chikungunya, e podem ser divididas em dois estágios de infecção. A infecção aguda, é caracterizada por uma alta viremia, e a crônica, pelas dores persistentes nas articulações nomeadas artralgia (THIBERVILLE et al., 2013).

Entre 72 a 97% das pessoas infectadas com CHIKV desenvolvem a infecção sintomática, com início repentino de febre e dores severas nas articulações (KENDRICK; STANEK; BLACKMORE, 2014). Outros sintomas são dores de cabeça, artrite, vômitos,

artralgia, mialgia e outros (THIBERVILLE et al., 2013). O agravamento da doença é devido à inexistência de tratamento antiviral específico aprovado ou vacinas licenciadas. O tratamento atual é paliativo e inclui repouso, administração de analgésicos, antitérmicos ou anti-inflamatórios e corticoides para controlar artralgia e mialgia (QUEYRIAUX et al., 2008).

O ciclo replicativo do CHIKV começa com a adsorção da proteína de envelope E2 com os receptores de membrana da célula hospedeira *prohibitin* (PHB) (WINTACHAI et al., 2012), fosfatidilserina (PtdSer) (MOLLER-TANK et al., 2013), glicosaminoglicanos (GAGs) (SILVA et al., 2014) ou ATPsintase β (FONGSARAN et al., 2014), formando um poro celular. Então, o capsídeo viral é endocitado e então ocorre o desnudamento do vírus, onde ocorre a liberação do material genético liberado e o processo de replicação se inicia. O genoma viral (figura 2) é traduzido diretamente nas proteínas não estruturais nSP1, nSP2, nSP3 e nSP4, que formam o complexo replicativo responsável por catalisar a síntese de uma fita de mRNA de polaridade negativa, que serve de molde para sintetizar outra fita com polaridade positiva e RNA subgenômico. O RNA subgenômico é traduzido em uma poliproteína que é processada para produzir as proteínas estruturais C, E3, E2, 6K e E1, seguido da montagem dos componentes virais, e a liberação das novas partículas (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; GOULD et al., 2010). (Figura3)

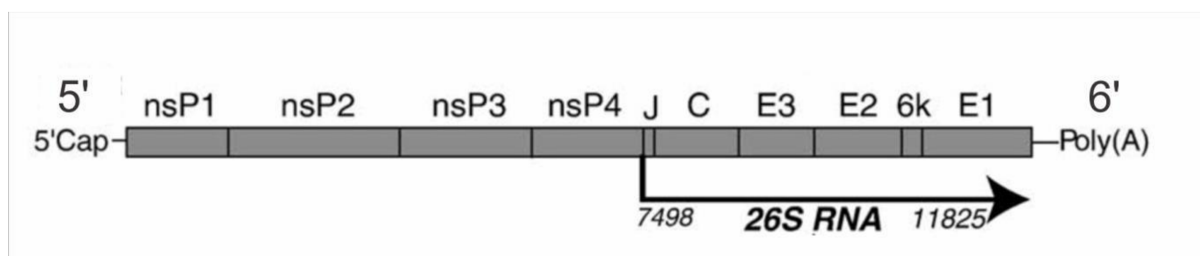


Figura 2 esquemática da organização do genoma do CHIKV. Adaptado de (SOLIGNAT et al., 2009

)

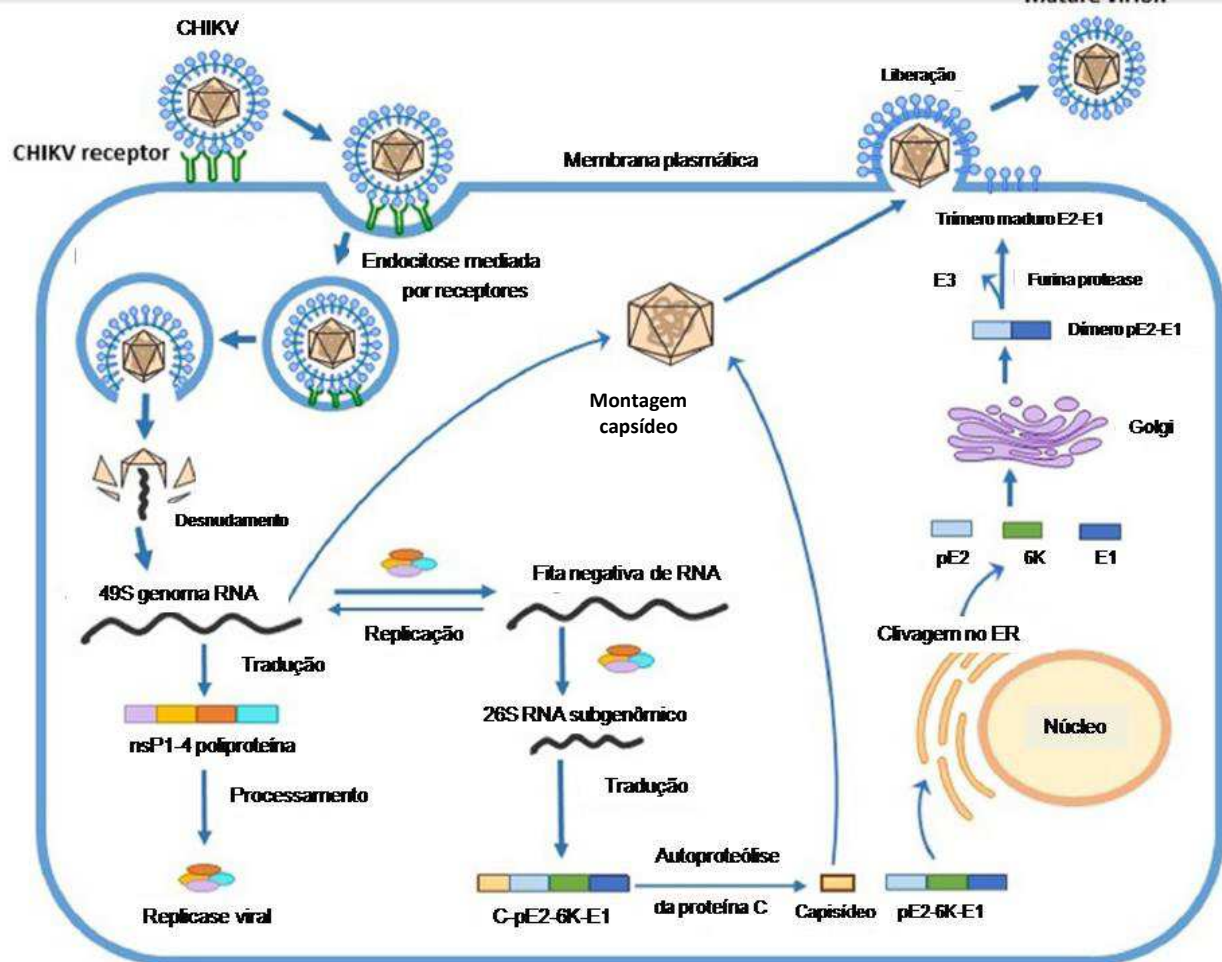


Figura 3. Esquema representativo da replicação do vírus Chikungunya. Adaptado de (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015)

Primariamente, as infecções provocadas por CHIKV eram restritas às regiões da África e Ásia, caracterizadas por epidemias esporádicas e separadas por anos de quiescência (HIGGS; ZIEGLER, 2010). Em 2005, iniciou-se um surto de CHIKV em varias ilhas do oceano Índico (SCHUFFENECKER et al., 2006). Devido a circulação considerável de pessoas em regiões de transmissão (tropicais e subtropicais), o vírus atingiu países como Itália e a França em 2007 (GRANDADAM et al., 2011; REZZA et al., 2007). Em 2013, o surto tomou uma proporção global atingindo a América Central nas Ilhas do Caribe (MOWATT; JACKSON, 2014; YACTAYO et al., 2016). A partir de então, o vírus se espalhou para a América, incluindo o Brasil (VEGA-RUA et al., 2014).

Segundo o CDC (*Center for disease Control And Prevention - USA*), até abril de 2016 mais de 100 países já registraram casos de febre Chikungunya (CENTERS, 2016) (Figura 4). Dados do ministério da saúde, em 2016 foram registrados 38.332 casos prováveis de Febre Chikungunya e foram confirmados 6 óbitos por conta da doença (BRASIL, 2016). Entre 1/1/2017 e

19/08/2017 foram registrados 167.813 casos suspeitos de Febre Chikungunya, sendo que a região nordeste apresenta o maior numero de casos prováveis, e foram confirmados 86 óbitos por conta deste vírus (BRASIL, 2017).

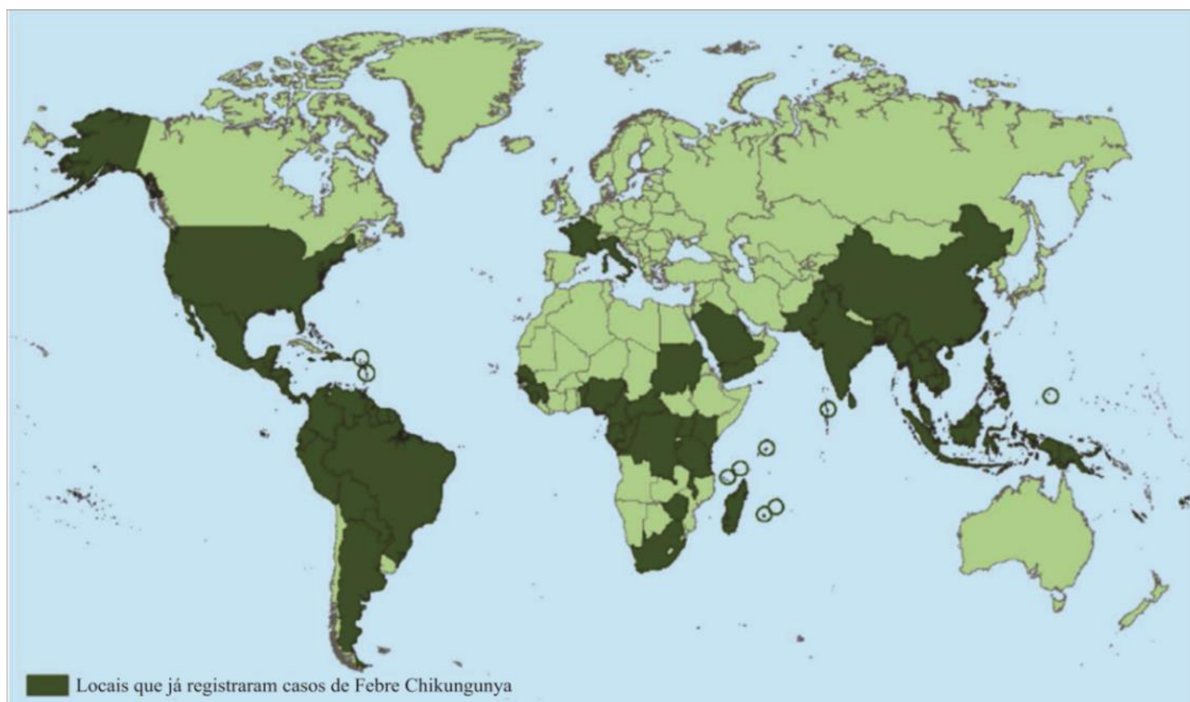


Figura 4. Esquema representando os países que já registraram casos de Febre Chikungunya de acordo com o CDC. Adaptado de (CENTERS, 2016).

1.2. Zikavírus

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae* e o gênero *Flavivirus*, mesma classificação do DENV. É um vírus envelopado, medindo 25-30 nm, de fita de RNA simples e polaridade positiva com aproximadamente 22 kb (Figura 5) (SHI; GAO, 2017). O vírus foi isolado pela primeira vez em 1947 na Uganda, do soro de um macaco *Rhesus* durante uma pesquisa de febre amarela na floresta de Zika (DICK et al., 1952).

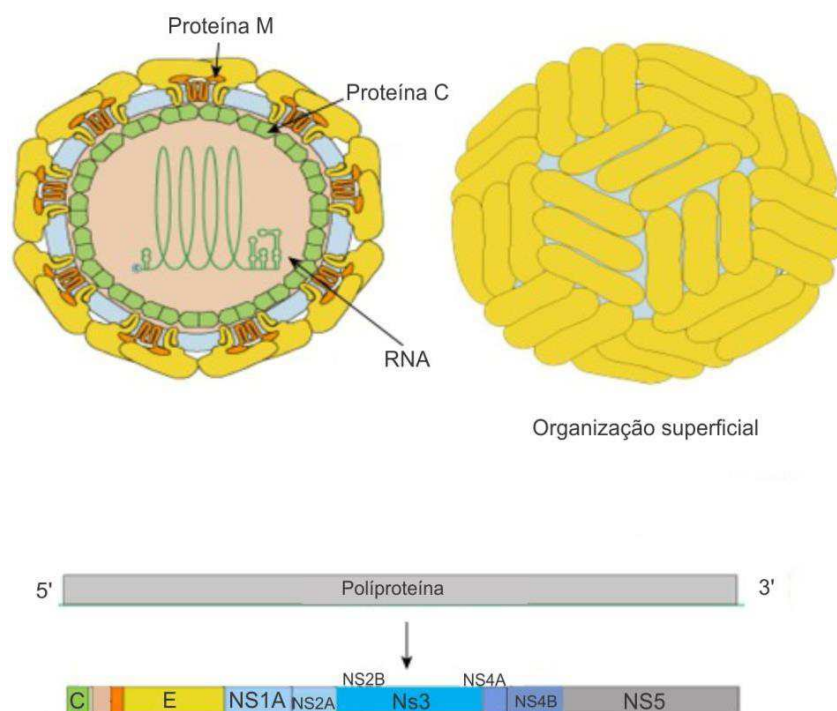


Figura 5. Ilustração da estrutura viral do ZIKV e sequência genômica. Adaptado de (KAUSHIK et al., 2017)

O ciclo replicativo do ZIKV se inicia pela interação da proteína E do envelope com receptores específicos do hospedeiro, seguido da endocitose mediada pela proteína clatrina, e a fusão em ambiente com pH ácido. Após a entrada da partícula viral ocorre a fusão da membrana viral com a membrana endossômica do hospedeiro para o desnudamento do genoma viral. Liberado o material genético, inicia a tradução do genoma viral para formação da poliproteína no retículo endoplasmático, onde essa é processada pelas proteases virais em 10 proteínas estruturais e não-estruturais. As proteínas não estruturais estão associadas ao processo replicativo das novas moléculas de RNA de polaridade positiva, a partir de um monte de RNA polaridade negativa. Acontece então a montagem e a maturação das novas partículas virais que são transportadas por vesículas estruturais do complexo de Golgi e secretadas para fora da célula (Figura 6) (CHAMBERS et al., 1990; NAYAK; ROTH; MCGAVERN, 2014).

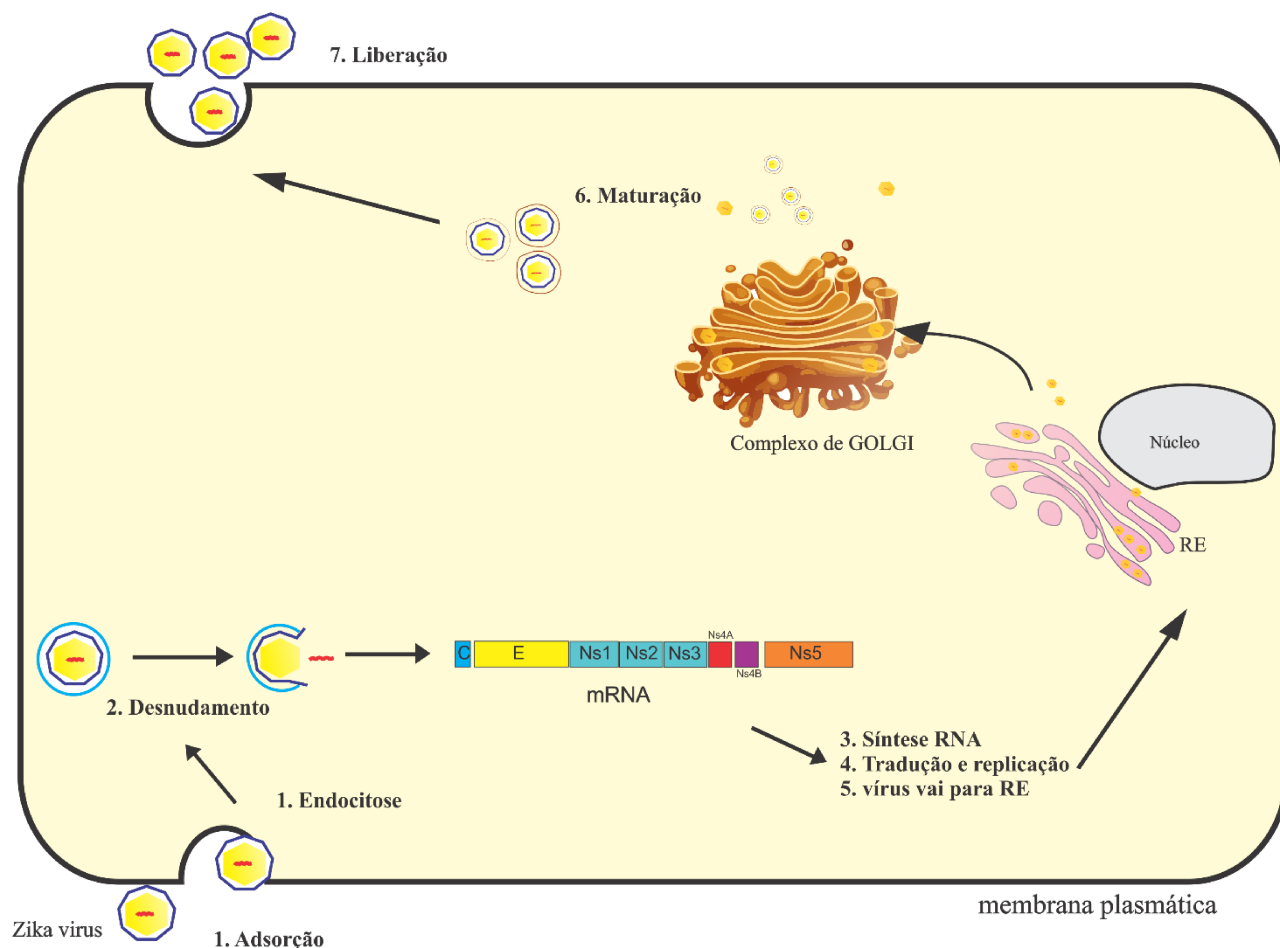


Figura 6. Ciclo replicativo do ZIKV.

O ZIKV é transmitido principalmente durante a hematofagia da fêmea dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Entretanto, alguns autores já relataram outros mosquitos do gênero *Aedes* que transmitem o ZIKV (CALVEZ et al., 2016). Anticorpos contra o ZIKV já foram detectados em primatas selvagens, alguns roedores e animais domésticos (DARWISH et al., 1983). Outras vias de transmissão, como transfusão de sangue, sexual, e transplacentar já foram identificadas (BARJAS-CASTRO et al., 2016; ROWLAND et al., 2016).

Assim como o CHIKV, o ZIKV afeta atualmente um grande número de países. De acordo com dados do CDC (CDC, 2017) e o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças já foram notificados casos de febre Zika em diversos países do globo (Figura 7), incluindo os dois hemisférios. Os casos mais graves foram aqueles relacionados com o desenvolvimento de um quadro de microcefalia em recém nascidos (SCHULER-FACCINI et al., 2016). Em 2016 foram registrados 21.1770 casos suspeitos de febre causada pelo ZIKV e 8 óbitos. Em 2017 já foram confirmados 6.587 casos de febre causada pelo ZIKV e são poucos os dados fornecidos pelos órgãos governamentais brasileiros sobre o impacto desse vírus nos casos de microcefalia (BRASIL, 2017).

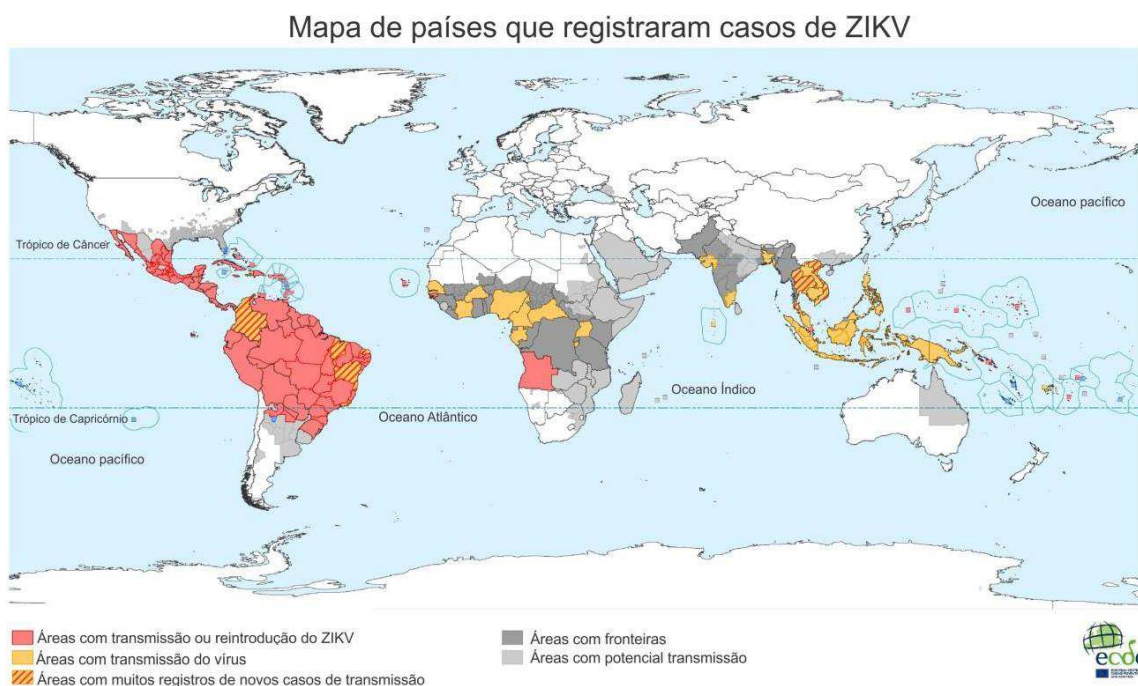


Figura 7. Países com transmissão do ZIKV. Fonte: Adaptado do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças, Transmissão atual do ZIKV. ([HTTPS://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/images/ZikaMap_OutbreakClassificationWorld%20wide.png](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/images/ZikaMap_OutbreakClassificationWorld%20wide.png))

Quando infectado com o ZIKV, o paciente que manifesta sintomas clínicos desenvolve a denominada Febre do Zika, caracterizada por dores de cabeça, febre, mal-estar e dores nas juntas (MUSSO; GUBLER, 2016). O ZIKV está associado ao aumento nos casos de microcefalia em neonatos em diversas regiões do Brasil. Além disso, foi relatado um aumento de casos da síndrome de Guillain-barré e quadros de meningoencefalite concomitante com os surtos de ZIKV (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2016).

1.3. Compostos naturais como antivirais

Muitos compostos naturais já demonstraram atividade antiviral contra diversos vírus como o DENV (TEIXEIRA et al., 2014), vírus da febre amarela (JULANDER, 2013), vírus da hepatite C (HCV) (JARDIM et al., 2015) e vírus da Influenza (SERKEDJIEVA; GEGOVA; MLADENOV, 2008). Tendo em vista este cenário, o estudo de compostos naturais como alternativa na terapia para o tratamento do CHIKV vem sendo realizado (BOURJOT et al., 2012; VÁZQUEZ-CALVO et al., 2017).

Alcalóide é uma classe de compostos naturais derivados principalmente de plantas,

caracterizados pela presença de um anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio em sua estrutura (WANSI et al., 2013). Os alcalóides têm atraído atenção nas últimas décadas devido suas propriedades biológicas que inclui a inibição de vírus humanos patogênicos como o vírus da herpes (GOODELL; MADHOK; FERGUSON, 2006; LOWDEN; BASTOW, 2003), adenovírus (ZARUBA ET AL., 2003) e HCV (STANKIEWICZ-DROGON et al., 2008). Apesar das atividades antivirais já documentadas de alcalóides, são poucos os estudos dessa classe de compostos no ciclo replicativo do CHIKV e ZIKV (KAUR et al., 2013; LILLSUNDE et al., 2014; VARGHESE et al., 2016).

As acridonas são uma subclasse dos alcalóides e seus efeitos antivirais, ou de seus derivados, já foram citados para o vírus Junin (JUNV) (SEPÚLVEDA et al., 2012), DENV (MAZZUCCO et al., 2015), HCV (CAMPOS et al., 2017) vírus da Herpes, Vaccinia e Estomatite Vesicular (DAGHIGH et al., 2015; STANKIEWICZ-DROGON et al., 2008)

Apesar de apresentarem atividade antiviral documentada, compostos naturais também apresentam algumas limitações como tempo de crescimento da planta para isolamento e purificação dos compostos, dificuldade de isolamento, quantidade produzida e citotoxicidade. Deste modo, a síntese de compostos com base em moléculas naturais descritas apresenta-se como uma alternativa para superar estas desvantagens. A classe de compostos sintéticos baseados em alcalóides que foi utilizada neste trabalho inibiu em 80% a infecção do HCV *in vitro* (CAMPOS et al., 2017), demonstrando o potencial desta classe de composto quando sintetizados. Além disso, o processo de síntese pode ser racionalizado, de forma a manipular e produzir moléculas com aumento de atividade biológica e menos toxicidade, em processo sustentável. Adicionalmente, compostos sintéticos podem ser patenteados e produzidos em larga escala, permitindo aplicabilidade como futuro tratamento antiviral.

2. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antiviral de alcalóides sintéticos na replicação do CHIKV e infecção do ZIKV.

2.1. Objetivos específicos

- Estabelecer uma linhagem celular a partir de células Huh 7.0 (*Human hepatocarcinoma*) que expressem continuamente o RNA do replicon subgenômico CHIKV RLUCFL-5A-PG. Avaliar a citotoxicidade em tratamento com alcalóides sintéticos na linhagem contínua de Huh7-CHIKV RLUC FL-5A-PG e células Vero por meio de ensaio de citotoxicidade (MTT);
- Produzir partículas virais ZIKV expressando *Nanoluciferase* e estabelecer um sistema infeccioso em células Vero;
- Investigar o potencial dos alcalóides sintéticos na replicação do CHIKV RLUC FL-5A-PG e na infecção do ZIKV *in vitro*.

3. Material e Métodos

3.1. Compostos

Os alcalóides sintéticos que foram avaliados neste trabalho foram desenvolvidos e cedidos gentilmente pelo grupo de pesquisas do Laboratório de Química Verde e Medicinal da UNESP de São José do Rio Preto. Os compostos foram dissolvidos em Dimetil-sulfóxido (DMSO) e mantidos em solução estoque a -80°C.

3.2. Replicon subgenômico deCHIKV

O replicon subgenômico utilizado para o estabelecimento da linhagem estável foi o CHIKV RLUC FL-5A-PG (Figura 4). Esta construção foi gentilmente cedida pelo Prof. Andres Merits do Instituto de Tecnologia da Universidade de Tartu, Estônia, para o Laboratório de Virologia da UFU. O replicon CHIKV RLUC FL-5A-PG contém regiões que codificam proteínas virais não estruturais (ns) 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.

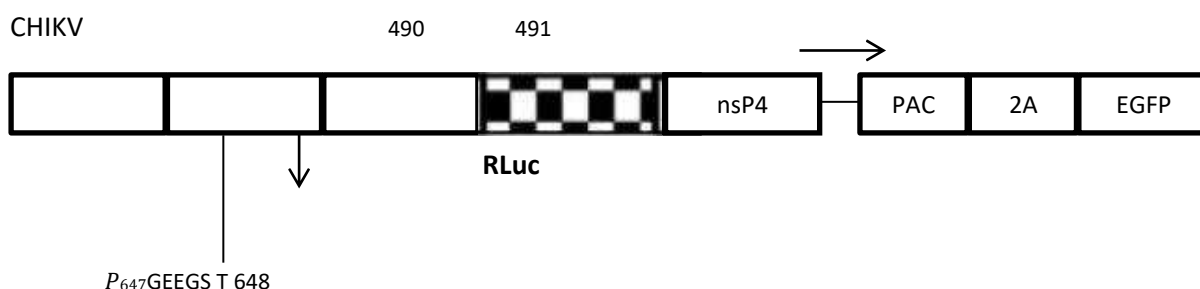


Figura 4. Replicon subgenômico CHIKV RLUC FL-5A-PG (POHJALA et al., 2011; UTT et al., 2015)

3.3. Preparação do replicon CHIKV para transfecção das células

Bactérias *E. coli* DH5α foram transformadas com plasmídeo pCHIKV RLUC FL-5A-PG. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB sólido com 50 µg/ml de

ampicilina a 37°C por 16 horas. Uma única colônia foi cultivada em meio LB líquido seguido à 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 (Sigma, USA), e purificados por meio do kit de purificação DNA Clean & Concentrator™ (ZymoResearch, USA), de acordo com as instruções do fabricante. DNA plasmidial e 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 submetido à síntese do RNA do replicon por meio do kit SP6 Ribo MAX™ Express RNA Production System (Promega, USA), a reação foi composta por 10 µg de DNA linear, 20% tampão de transcrição e 25 mM rNTPs. Após a síntese, o ácido nucléico foi tratado com a enzima RQ DNaseI (Promega, USA) para a eliminar fitas de DNA remanescentes.

3.4. Cultura de Células

Células Huh-7.0 e Vero foram cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) e suplementado com 100 U de penicilina por ml, 100 U de streptomycin por ml, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (GIBCO-BRL) incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

3.5. Linhagem celular estável

Para avaliar o efeito dos alcalóides na replicação do CHIKV foi estabelecida uma linhagem estável de Huh 7.0 que expressa continuamente o replicon CHIKV RLUC FL-5A-PG. Para isso, 5×10^5 células Huh 7.0 foram transferidas para placas de 6 poços em meio de cultura onde foi adicionado o reagente DMRIE-C de transfecção (Invitrogen, USA). Para cada transfecção 10 µg do RNA do replicon foram diluídos em 500 µl Opti-MEM I™ (Invitrogen), e adicionados as células por 4 h. As células transfectadas foram então adicionadas de meio DMEM suplementado e do antibiótico puromicina (5 µg/mL), e foram mantidas sob seleção por aproximadamente 20 dias. A linhagem foi então submetida a teste quanto à expressão do replicon por meio de quantificação de luminescência e imunofluorescência.

3.6. Produção de partículas de Zika

Para produzir novas partículas virais de ZIKV *in vitro*, o plasmídeo contendo o genoma completo do ZIKV com gene repórter *Nanoluc* (Nluc) (figura 8) foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR –*Polymerase Chain Reaction*), utilizando a enzima Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher, USA). A reação foi composta de 10 ng do plasmídeo de DNA; 5% GCbuffer; 10 mM dNTPs; 100u M-Zik-Forward (CG ATT AAG TTG GGT AAC GCC AGG GT), 100u M-Zik-Reverse (T AGA CCC ATG GAT TTC CCC ACA CC) e dimetilsulfoxido (DMSO). As condições de temperatura foram: 98 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 67 °C por 15 segundos, 72 °C por 21 minutos. O produto da PCR foi purificado com o kit *DNA Clean & Concentrator*™ (ZymoResearch, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida o produto da purificação foi submetido a transcrição com o kit SP6 Ribo MAX™ *Largescale RNA Production Systems* (Promega, USA).



Figura 8. Esquema da construção do vírus ZIKV com *Nanoluc*.

O RNA do ZIKV foi eletroporado em células Vero para a produção e propagação do ZIKV-*Nanoluc*. Para isso, uma suspensão de células Vero em PBS (Tampão Fosfato – *Phosphate Buffer Solution*) foi adicionada de 10 µL de RNA viral em uma cuvetas de 4mm e submetidas à eletroporação à 450 V e 600 µF. Seguindo a eletroporação, as células foram ressuspensas em DMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino e divididas em duas garrafas de culturas de células de 25 cm². As células eletroporadas foram monitoradas por cinco dias e o sobrenadante foi coletado e armazenado no -80 °C.

3.7. Ensaio de placa

Para determinar o título do sobrenadante de ZIKV-*Nanoluc* coletado, 1.5×10^5 células Vero por poço foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, uma diluição seriada do sobrenadante de ZIKV-*Nanoluc* (figura 8) foi adicionada às células por uma hora. Após esse período, o inóculo foi removido, as células foram lavadas com PBS para remoção dos vírus não adsorvidos, e adicionadas de meio DMEM suplementado com 1% penicilina, 1% de aminoácidos não essenciais, 2% de soro fetal bovino e 1% de carboximetilcelulose (CMC). As células foram incubadas de 5 a 7

dias a 37°C e 5% de CO_2 . Depois da incubação o meio foi removido e as células foram fixadas e coradas com formaldeído 4% e 0.4% de cristal violeta para visualizar a formação de focos consequentes do efeito citopático provocado na liberação da partículaviral.

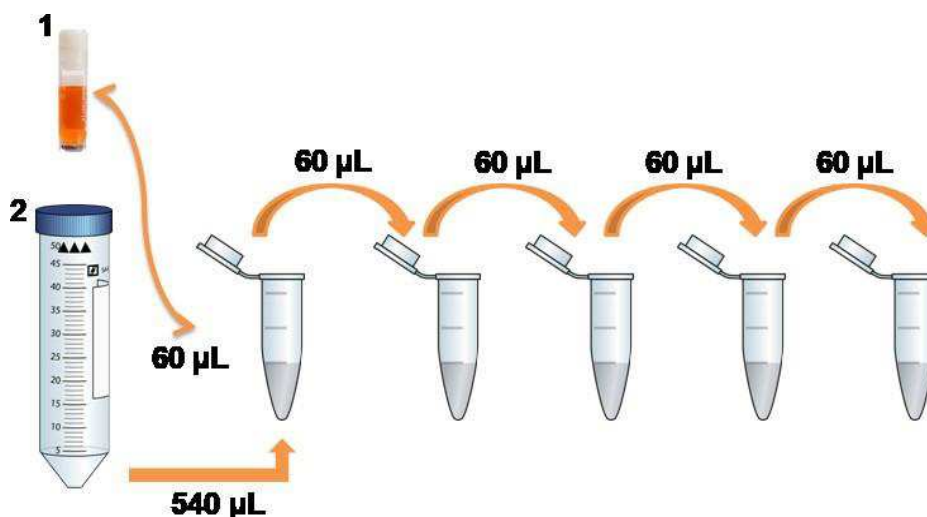


Figura 8. Esquema representativo da diluição seriada realizada para conceder o experimento de ensaio de placa. Inicialmente 540 µL de meio de infecção (2) foi adicionado a cinco microtubos, em seguida 60 µL da alíquota original de vírus ZIKV-*Nanoluc* (1) foram adicionados no primeiro microtubo, homogeneizado, e 60 uL foram transferidos para o tubo 2 e assim sucessivamente.

3.8. Ensaio MTT decitotoxicidade

Para determinar a porcentagem da citotoxicidade, 1×10^4 de células Huh7-CHIKV RLUC FL-5A-PG ou Vero foi transferida para microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida foram adicionadas de meio de cultura contendo os compostos sintéticos e incubadas por 72 horas. O sobrenadante foi removido e as células foram adicionadas de solução contendo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT) (Sigma-Aldrich, USA) a 1mg/ml em meio de cultura, e incubadas a 37°C por 30 minutos. A solução MTT foi então removida, substituída pelo mesmo volume de DMSO (Dimetil sulfoxido – *Dimethylsulfoxide*) e submetida à leitura de comprimento de onda de 490 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada pela média dos poços tratados x 100/ média dos poços do controle não tratado.

Todo o experimento foi realizado em triplicata e em pelo menos dois eventos independentes. DMSO foi utilizado como controle não tratado, Ribavirina como controle positivo para CHIKV (POHJALA et al., 2011) e Obatoclax para ZIKV (KUIVANEN et al.,

2017).

3.9. Ensaio antiviral em replicon subgenômico(CHIKV)

Para avaliar o efeito dos alcalóides sintéticos na replicação do CHIKV, 1×10^4 de células Huh7 - CHIKV RLUC FL-5A-PG foi transferida para microplacas de 96 poços branca. Após aderência celular, os compostos foram adicionados em concentrações específicas e incubados por 72 horas. Em seguida, o meio de cultura contendo os compostos foi removido, as células foram lavadas com PBS e adicionadas de tampão de lise Renilla (*Renilla lucíferas lysis buffer*; Promega, USA) por 30 min. Os lisados celulares foram adicionados de reagente para ensaio de Renila Luciferase (*Renilla Luciferase Assay Reagent*; Promega, USA) e a leitura de luminescência foi realizada em leitor de placa Glomax® (Promega, USA). Todos os dados foram obtidos a partir da média dos poços tratados $\times 100$ / média dos poços do controle não tratado. Os valores obtidos da leitura de atividade de luminescência foram analisados em planilha Excel e pelo software GraphPadPrism©.

3.10. Ensaio antiviral em vírus completo(ZIKV)

Para avaliar o potencial dos alcalóides sintéticos na infecção do ZIKV-*Nanoluc*, 1×10^4 células Vero foram plaqueadas em placas de 96 poços branca e incubadas por 24 horas. Concentrações não citotóxicas dos compostos e ZIKV-*Nanoluc* (MOI=0.1) foram diluídos em DMEM soro fetal bovino 2% e adicionados as células e incubados por 72 horas. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e tratadas com tampão de lise *Renilla Passive Lysis Buffer* (Promega, USA) por 30 minutos. Os lisados foram adicionados de reagente para ensaio de luciferase (*Renilla Luciferase Assay Reagent*; Promega, USA) e a leitura dos níveis de luminescência foi realizada em leitor de placa Glomax® (Promega, USA). Todos os dados foram obtidos a partir da média dos poços tratados $\times 100$ / média dos poços do controle negativo e analisados em planilha Excel e pelo software GraphPad Prism©

4. Resultados

4.1. Estabelecimento da linhagem estável Huh7-CHIKV RLUCFL-5A-PG

Para a obtenção do RNA contendo a sequência do replicon CHIKV RLUC FL-5A-PG, foram utilizadas bactérias *E. coli* cepa DH5- α competentes, as quais foram transformadas com o plasmídeo pCHIKV RLUC FL-5A-PG. Após extração e purificação, o plasmídeo foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop®, ThermoScientific) (Tabela 1), submetido a linearização e o DNA linear foi purificado e quantificado (Tabela 1). Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% e brometo de etídeo (figura 6).

Tabela 1. Tabela com as quantidades de DNA plasmidial CHIKV RLUC-FL-5A-PG e linear obtidas em espectrofotômetro (Nanodrop®, ThermoScientific).

Plasmídeo	1003,7ng/ μ L
DNALinear	64,8 ng/ μ L

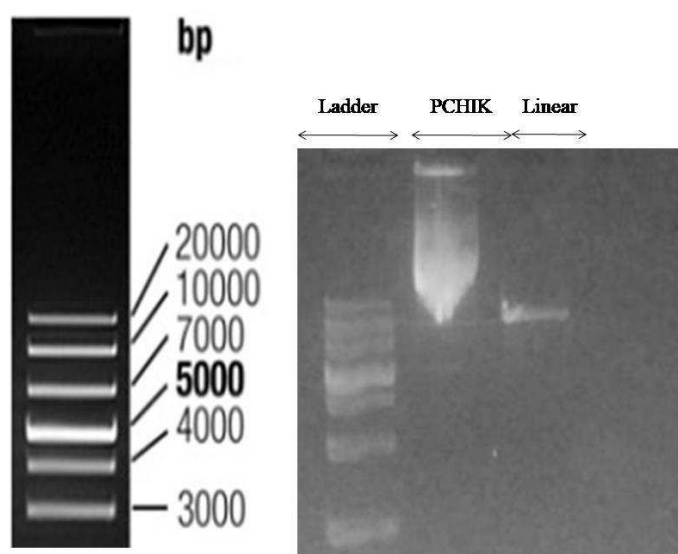


Figura 6: DNA plasmidial purificado CHIKV RLUC-FL-5A-PG.DNA (pCHIKV) e DNA linear CHIKV RLUC-FL-5A-PG.DNA (linear) obtido a partir da digestão com enzima NOTI, e purificado a partir do kit DNA Clean &Concentrator TM (ZymoResearch). Produtos visualizados em gel de agarose 1% e brometo de etídeo submetidos à luz ultravioleta. Marcador molecular de 1 kb (GeneRulerTM 1kb DNA Ladder Plus, Fermentas, Life Sciences).

O DNA linear foi submetido a transcrição e o mRNA RLUC FL-5A-PG foi transfectado em células Huh 7.0 como descrito nos métodos. A seleção completa foi obtida após 20 dias do início do tratamento. As células Huh 7.0 que expressavam o replicon CHIKV RLUC FL-5A-PG foram mantidas em puromicina 5 µg/mL e observadas constantemente em microscópio de fluorescência para confirmação da expressão do RNA nas células através do EGFP. A linhagem estável foi denominada Huh- CHIKV RLUC FL-5A-PG (Figura 7).

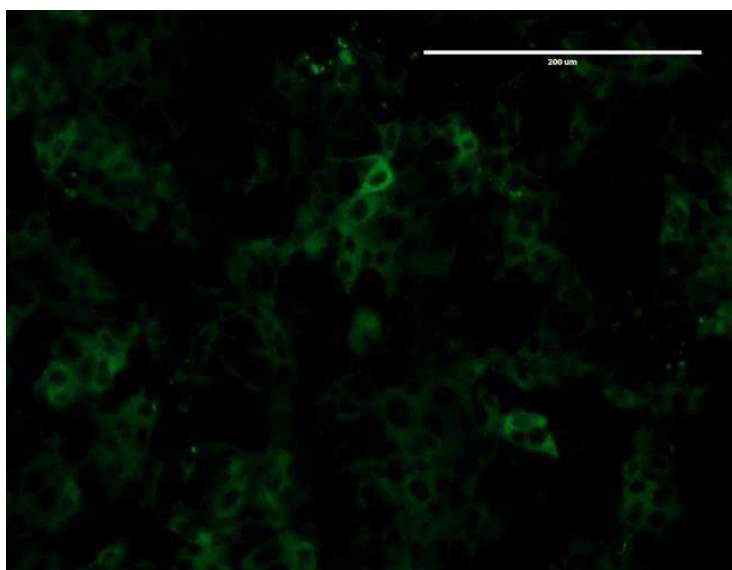


Figura 7. Células Huh 7.0 expressando mRNA CHIKV RLUC FL-5A-PG observadas em microscópio de imunofluorescência (EVOS) com objetiva de 10x e com filtro GFP (509 nm).

4.2. Ensaio de viabilidade

Para uma avaliação inicial da concentração a ser utilizada nos ensaios antivirais e para investigar o potencial citotóxico dos compostos, as células foram tratadas com os alcalóides sintéticos nas concentrações finais de 50 µM, 10 µM, 2 µM e 0.4 µM. De acordo com os resultados obtidos, uma concentração para cada composto foi selecionada para realização dos ensaios antivirais (Tabela 2). A porcentagem de citotoxicidade obtida após tratamento com cada composto em células Huh7 – CHIKV RLUC FL-5A-PG e Vero podem ser observados nas figuras 9 e 10. Os ensaios de viabilidade feitos utilizando a linhagem subgenômica Huh7 – CHIKV RLUC FL-5A-PG foram conduzidos para tratar dos dados da replicação do CHIKV, já os conduzidos em células Vero foram para analisar o efeito dos compostos sob as células da mesma linhagem que seria testada quanto à infectividade do

ZIKV-*Nanoluc*. Foram consideradas concentrações viáveis ou não tóxicas aquelas com viabilidade igual ou maior de 80 %.

Tabela 2. Tabela com os compostos e suas respectivas concentrações selecionadas para ensaios de atividade antiviral. O veículo utilizado para diluir os compostos foi DMSO Hybri-MaxTM, estéril-friltrado (Sigma,USA). Huh CHIKV*= Huh7 – CHIKV RLUC FL-5A-

Composto	Concentração (µM)	
	Huh CHIKV*	Vero
Fac 2	10	2
Fac 7	50	50
Fac 8	10	10
Fac 16	0.4	12.5
Fac 17	10	2
Fac 19	0.4	2
Fac 20	10	10
Fac 21	10	2
Fac 22	2	8

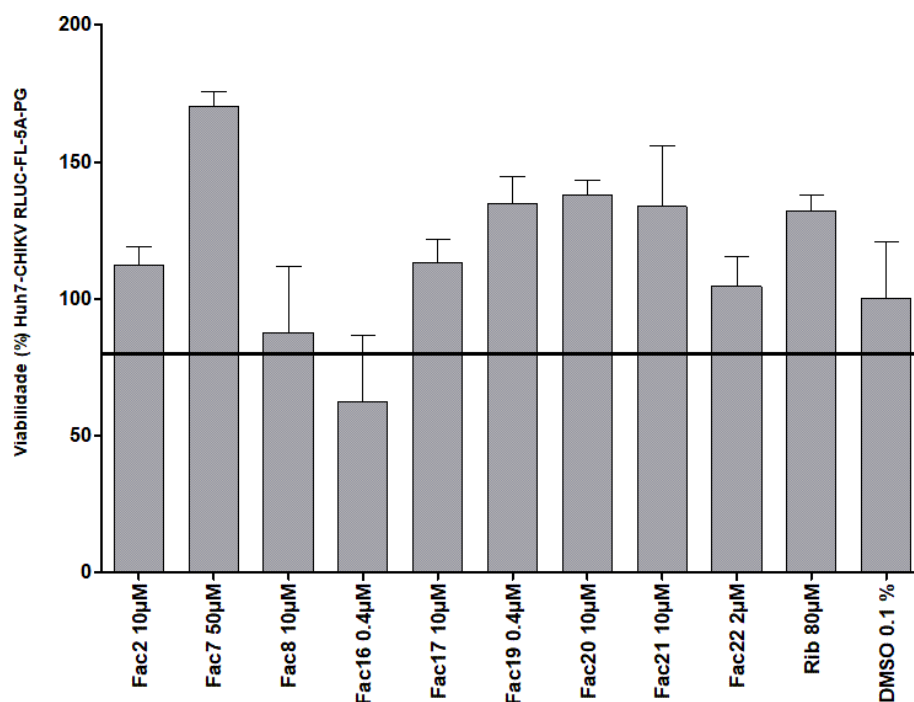


Figura 9. Gráfico da citotoxicidade do tratamento da linhagem Huh7-CHIKV-RLUC- FL-5A-PG com os alcalóides sintéticos. Os dados são expressos em porcentagem e foram normalizados a partir do resultado do controle não tratado DMSO.

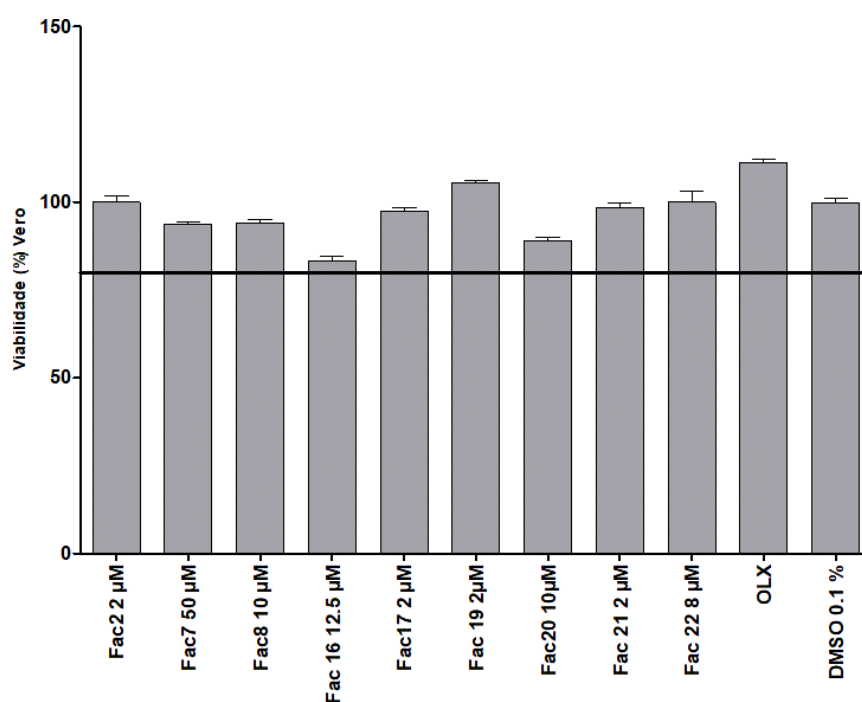


Figura 10. Gráfico da citotoxicidade de células Vero com os alcalóides sintéticos. Os dados são expressos em porcentagem e foram normalizados a partir do resultado do controle não tratado DMSO.

4.3. Ensaio de placa

A partir do ensaio de placa foi possível obter o título do ZIKV-*Nanoluc*. Na diluição de 10^{-3} o vírus formou 60 focos (figura 11) e a partir desse valor temos que há na alíquota 1×10^6 pfu/mL.

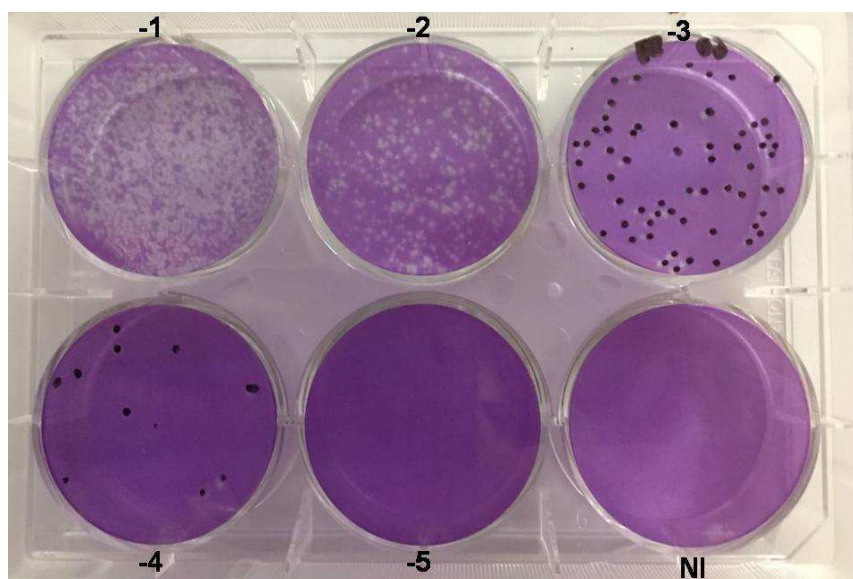


Figura 11. Titulação viral por ensaio de placa. Células VERO foram infectadas com ZIKV-*NanoLuc* por 1 hora e incubadas com meio CMC 1% por 5 dias. NI = não infectado

4.4. Replicação do CHIKV

Baseado nas concentrações não tóxicas, ou seja, concentrações com viabilidade acima de 80%, a atividade antiviral dos alcalóides sintéticos foram mensuradas na replicação CHIKV *in vitro* a partir do tratamento da linhagem celular Huh CHIKV RLUC-FL-5A-PG.. Os resultados demonstraram que o composto Fac 2 na concentração de 10 μ M inibiu 75,55 % da replicação do CHIKV, e não apresentou qualquer citotoxicidade as células tratadas (Figura 9 e 11; Tabela 3), Os demais compostos apresentaram pouco ou nenhuma atividade inibitória na replicação do CHIKV (Figura 12; Tabela 3).

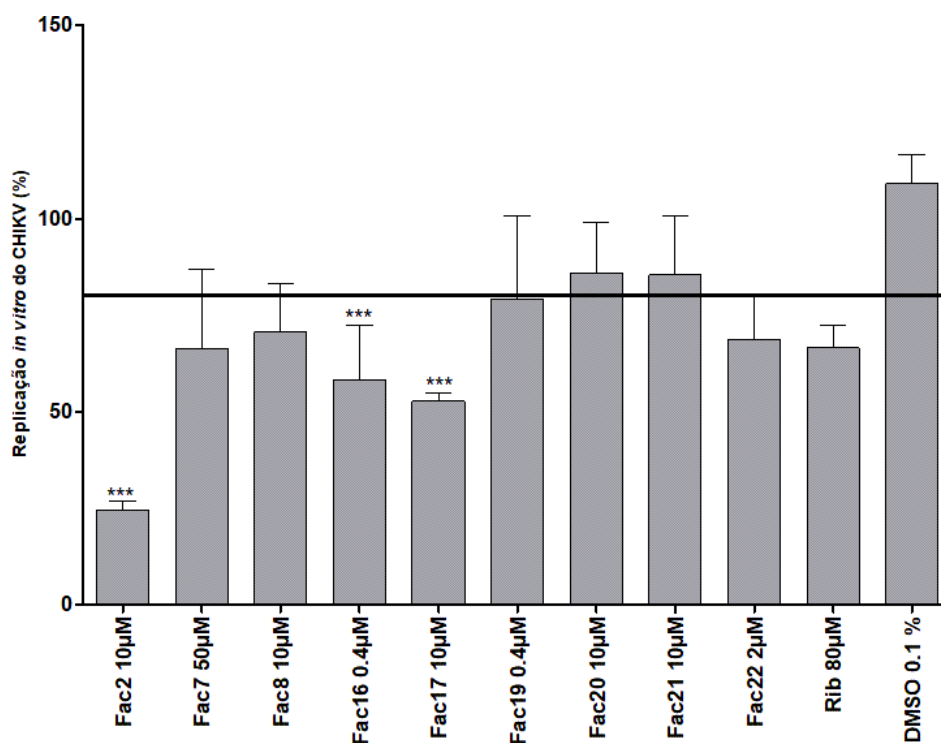


Figura 12. Atividade de alcalóides sintéticos na replicação do CHIKV. Ensaio de Renilla Luciferase para replicação *in vitro* do CHIKV na presença dos compostos testados, controle positivo e não tratado. Valores estatisticamente significantes estão representados pelo símbolo *** ($p < 0.01$).

Tabela 3. Atividade de compostos alcalóides sintéticos representada pelas porcentagens de citotoxicidade e inibição da replicação do CHIKV em células tratadas. Huh CHIKV = Huh7-CHIKV RLUC-FL-5A-PG

Composto	Viabilidade (%)	Inibição
	Huh CHIKV	CHIKV (%)
Fac 2	112.24	75.55
Fac 7	170.49	33.55
Fac 8	87.57	29.37
Fac 16	62.43	41.91
Fac 17	113.21	47.31
Fac 19	134.87	20.82
Fac 20	138.02	14.14
Fac 21	133.71	14.63
Fac 22	104.62	31.20
Ribavirina	132.23	38.83

4.5. Infecção ZIKV-Nanoluc

Baseado nas concentrações não tóxicas estabelecidas pelos ensaios de citotoxicidade, a atividade antiviral dos alcalóides sintéticos na infectividade do ZIKV *in vitro* foi avaliada. Os resultados dos ensaios de infecção na presença ou ausência dos compostos demonstraram que os alcalóides sintéticos Fac 7, 16 e 20 inibiram 48,4, 45, 5 e 34,7 % da Infectividade do ZIKV *in vitro*, respectivamente (Figura 12; Tabela 4).

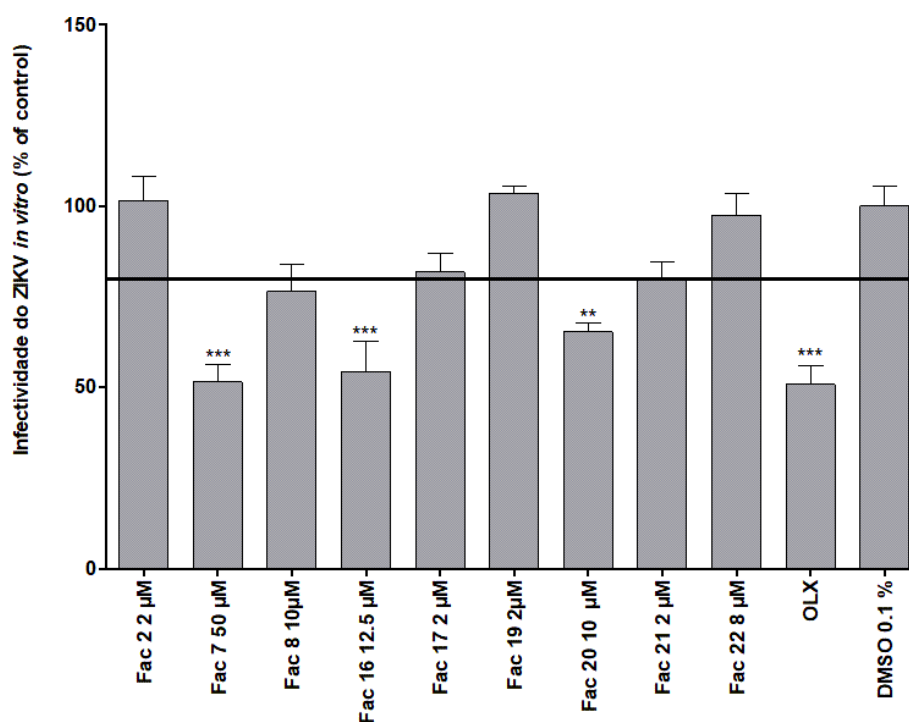


Figura 12. Atividade de alcaloides sintéticos na infectividade do ZIKV. Ensaio de Renilla Luciferase para infectividade *in vitro* do ZIKV-Nanoluc na presença dos compostos testados, controle positivo e controle não tratado. Os dados são expressos em porcentagem e os valores estaticamente significantes estão representados pelo símbolo *** ($p < 0.01$).

Tabela 4. Atividade de compostos alcalóides sintéticos representada pelas porcentagens de citotoxicidade e inibição da infectividade do ZIKV em células tratadas.

Composto	Viabilidade Vero (%)	Inibição ZIKV (%)
Fac 2	100	0
Fac 7	93.73	48.42
Fac 8		23.47
Fac 16	94.10	45.53
Fac 17	55.92	18.21
Fac 19	97.59	0
Fac 20	105.51	34.68
Fac 21	89.12	19.59
Fac 22	98.65	4.49
Obatoclax	103.1	49.15

5. Discussão

Os alcalóides são uma classe que já apresentou atividade antiviral para outros vírus como DENV (DA SILVEIRA OLIVEIRA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2014), vírus da Febre Amarela (JULANDER, 2013) e HCV (JARDIM et al., 2015). As arboviroses afetam grande número de humanos como já citado neste trabalho, as causadas pelo CHIKV e ZIKV não possuem tratamento antiviral específico, por esse motivo é importante o estudo de moléculas que apresentem atividade antiviral contra esses vírus. .

Com base nos resultados obtidos neste estudo é possível concluir que os alcalóides sintéticos Fac2, 7, 8, 17, 19, 20, 21 e 22 não são tóxicos para a linhagem de células Huh 7-CHIKV RLUC FL-5A-PG-IL ou Vero nas concentrações testadas. Zidar e colaboradores (2014) testaram concentrações maiores que as testadas neste trabalho, entre 100 e 50 μ M, de alcalóides e derivados sintéticos para linhagem de células Huh 7.0 e não diminuíram a citotoxicidade (ZIDAR et al., 2014). Campos e colaboradores (2017) mostraram que uma acridona sintética na concentração de 10 μ M apresenta viabilidade de mais de 95% em linhagem celular semelhante a utilizada neste trabalho, a Huh 7.5 (CAMPOS et al., 2017). Outros trabalhos demonstraram que essa classe de composto não diminuem a viabilidade de células Vero em determinadas concentrações (NAWAWI et al., 1999; VIJAYAN et al., 2014).

O alcalóide Fac 2 na concentração 10 μ M inibiu 75.55% da replicação do CHIKV. Outros trabalhos demonstraram que alcalóides são potenciais inibidores da replicação do CHIKV (KAUR et al., 2013; LILLSUNDE et al., 2017; VARGHESE et al., 2016). No trabalho de KAUR e colaboradores, os autores demonstraram que o alcalóide Harringtonine interfere na síntese de RNA e proteínas virais, interferindo principalmente com a proteína estrutural de envelope E2 e não estrutural nsP3, demonstrando que este alcalóide possui atividade antiviral na replicação do vírus (KAUR et al., 2013).

Outra pesquisa que utilizou um sistema de replicon semelhante ao deste trabalho demonstrou que análogos de alcalóides marinhos inibiram 50% ou mais da replicação do vírus CHIKV (LILLSUNDE et al., 2014). Varghese e colaboradores (2016) trataram células BHK 21 expressando replicon subgenômico semelhante ao deste trabalho com diversos compostos e demonstraram que o alcalóide *Berberine* inibiu a replicação do CHIKV (VARGHESE et al., 2016). Um estudo *in silico* demonstrou que vários alcalóides interagem com a proteína nsP2, uma protease, podendo estas moléculas apresentarem atividade antiviral

em algum nível da replicação dos *Alphavirus* (KENDALL et al., 2016).

Campos e colaboradores (2017) mostraram que uma acridona sintética inibiu mais de 90 % da replicação do HCV utilizando um sistema de replicon subgenômico SGR-Feo-JFH-1. Já quando utilizando vírus completo, o composto inibiu a replicação em quase 70% e a liberação de novas partículas virais em quase 80% (CAMPOS et al., 2017). Todos estes resultados corroboram com o desempenho do alcalóide sintético Fac 2 indicando que este composto é um potente inibidor da replicação do CHIKV, sendo um potencial candidato no tratamento antiviral da Febre Chikungunya.

Os resultados obtidos dos ensaios de atividade antiviral contra ZIKV demonstraram menores taxas de inibição comparadas com os dados obtidos para CHIKV. Entretanto, 3 moléculas inibiram significativamente a infectividade do ZIKV. O melhor desempenho foi do composto Fac 7 que inibiu 48,42 % da infecção do ZIKV-*Nanoluc* quando comparado ao controle. Outros trabalhos demonstraram que alcalóides sintéticos possuem atividade antiviral contra flavivirus, da mesma classe que o ZIKV. Um estudo demonstrou que o alcalóide Hisurtine inibiu as etapas finais do ciclo de replicativo de DENV (HISHIKI et al., 2017), assim como Campos e colaboradores (2017) demonstraram atividade antiviral de uma acridona sintética contra o HCV (CAMPOS et al., 2017). Os resultados são promissores, visto que essas moléculas são permissivas de manipulação química e poderão ser modificadas e avaliadas a fim de se obter uma melhora na atividade antiviral já apresentada.

Os dados obtidos demonstram que o alcalóide sintético Fac 2 possui atividade antiviral na replicação do vírus Chikungunya, e os Facs 7, 16 e 20 inibiram a infectividade do por ZIKV *invitro*. Experimentos futuros são necessários para fornecer uma melhor compreensão de como estes compostos atuam no ciclo de replicação do ZIKV e CHIKV.

6. Referências bibliográficas

ABBASI, A.-N. ZIKA VIRUS INFECTION; VERTICAL TRANSMISSION AND FOETALCONGENITAL ANOMALIES. **Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC**, v. 28, n. 1, p. 1–2, [s.d.].

ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 121, n. June, p. 59–68, 2015.

AMRAOUI, F.; FAILLOUX, A. B. Chikungunya: an unexpected emergence in Europe. **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 146–150, 2016.

BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, n. 7, p. 1684–1688, jul. 2016.

BOURJOT, M. et al. Prostratin and 12- O -Tetradecanoylphorbol 13-Acetate Are Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 12, p. 2183–2187, 2012.

CALVEZ, E. et al. Genetic Diversity and Phylogeny of Aedes aegypti, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2016.

CAMPOS, G. R. F. et al. Hepatitis C virus in vitro replication is efficiently inhibited by acridone Fac4. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 7, p. 1693–1701, 2017.

CENTERS, FOR D. C. AND P. Countries and territories where chikungunya cases have been reported. **Atlanta, GA, Octo. 23 2015**, p. 1, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. World Map of Areas with Risk of Zika. p. 2017, 2017.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression and replication. **Revista de Microbiologia**, v. 44, p. 649–688, 1990.

CUMAKOV, M. . et al. Arboviruses and Human Disease. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 369, p. 5–78, 1967.

DA SILVEIRA OLIVEIRA, A. F. C. et al. Potential antivirals: Natural products

- targeting replication enzymes of dengue and Chikungunya viruses. **Molecules**, v. 22, n. 3, 2017.
- DAGHIGH, L. R. et al. Synthesis, antiviral, and cytotoxic investigation of imidazo[4,5-a]acridones. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 11, p. 3912–3919, 2015.
- DARWISH, M. et al. A sero-epidemiological survey for certain in Pakistan arboviruses (Togaviridae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 442–445, 1983.
- DELATTE, H. et al. Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus*, a Vector of Chikungunya on La Réunion. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 249–258, 2010.
- DICK, G. W. ; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus: Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- FELDSTEIN, L. R. et al. The first reported outbreak of chikungunya in the U.S. Virgin Islands, 2014-2015. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 885–889, 2016.
- FELLNER, C. Zika in America : The Year in Review. **P&T**, v. 41, n. 12, p. 778–791, 2016.
- FONGSARAN, C. et al. Involvement of ATP synthase β subunit in chikungunya virus entry into insect cells. **Archives of Virology**, v. 159, n. 12, p. 3353–3364, 2014.
- GOODELL, J. R.; MADHOK, A. A.; FERGUSON, D. M. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity. v. 14, p. 5467– 5480, 2006.
- GOULD, E. A. et al. Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 111–124, 2010.
- GRANDADAM, M. et al. Chikungunya virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 910–913, 2011.
- GYAWALI, N.; BRADBURY, R. S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. The global spread of Zika virus: is public and media concern justified in regions currently unaffected? **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, p. 37, 2016.
- HIGGS, S.; ZIEGLER, S. A. A nonhuman primate model of chikungunya disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 3, p. 657–660, 2010.

- HISHIKI, T. et al. Hirsutine , an Indole Alkaloid of *Uncaria rhynchophylla* , Inhibits Late Step in Dengue Virus Lifecycle. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. August, p. 1–7, 2017.
- JARDIM, A. C. G. et al. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **ANTIVIRAL RESEARCH**, v. 115, p. 39– 47, 2015.
- JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiology**, v. 4, p. 837–856, 2009.
- JULANDER, J. G. Experimental therapies for yellow fever. **Antiviral Research**, v. 97, n. 2, p. 169–179, 2013.
- KAMGANG, B. et al. Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 57, 2012.
- KAUR, P. et al. Inhibition of Chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 155–167, 2013.
- KAUSHIK, A. et al. Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 308–317, 2017.
- KENDALL, A. et al. Alphavirus Protease Inhibitors from Natural Sources : A Homology Modeling and Molecular Docking Investigation. **Computational Biology and Chemistry**, v. 64, p. 163–184, 2016.
- KENDRICK, K.; STANEK, D.; BLACKMORE, C. Morbidity and Mortality Weekly Report. **Center for Disease Control and Prevention**, v. 63, n. 48, p. 1137, 2014.
- KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 2002.
- KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**, v. 4, n. JUNE2015, p. 1–18, 2015.
- KUIVANEN, S. et al. Obatoclax, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism. **Antiviral Research**, v. 139, n. 2017, p. 117–128, 2017.

- KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global Spread and Persistence of Dengue. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 71–92, 2008.
- LILLSUNDE, K. E. et al. Bioactive cembrane derivatives from the Indian Ocean Soft Coral, *Sinularia kavarattiensis*. **Marine Drugs**, v. 12, n. 7, p. 4045–4068, 2014.
- LILLSUNDE, K. E. et al. Marine alkaloid oroidin analogues with antiviral potential: A novel class of synthetic compounds targeting the cellular chaperone Hsp90. **Chemical Biology and Drug Design**, n. October 2016, p. 1–8, 2017.
- LINDSEY, N. P. et al. Chikungunya virus infections among travelers-United States, 2010- 2013. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 1, p. 82–87, 2015.
- LOWDEN, C. T.; BASTOW, K. F. Anti-Herpes Simplex Virus Activity of Substituted 1-Hydroxyacridones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5015–5020, 2003.
- MARINI, G. et al. First outbreak of Zika virus in the continental United States: a modelling analysis. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 37, p. 30612, 2017.
- MAZZUCCO, M. B. et al. Antiviral activity of an N-allyl acridone against dengue virus. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 29, 2015.
- MOLLER-TANK, S. et al. Role of the Phosphatidylserine Receptor TIM-1 in Enveloped- Virus Entry. **Journal of Virology**, v. 87, n. 15, p. 8327–8341, 2013.
- MORENS, D. M.; FAUCI, A. Chikungunya at the Door - Déjà Vu All Over Again? **The New England journal of medicine**, p. 885–887, 2014.
- MOWATT, L.; JACKSON, S. T. Chikungunya in the Caribbean: An Epidemic in the Making. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 3, n. 2, p. 63–68, 2014.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **American Society for Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.
- NASCI, R. S. Movement of chikungunya virus into the Western hemisphere. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 8, p. 1394–1395, 2014.
- NAWAWI, A. et al. Anti-Herpes Simplex Virus Activity of Alkaloids Isolated from *Stephania cepharantha*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 3, p. 268–274, 1999.

NAYAK, D.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B. Genome cyclization as a strategy for Flavivirus RNA replication. **Virus Research**, v. 139, n. 2, p. 367–402, 2014.

OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. Microcephaly and Zika virus. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 2, p. 103–105, 2016.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.

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.

PONLAWAT, A. et al. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 5, p. 844–9, 2005.

QUEYRIAUX, B. et al. Clinical burden of chikungunya virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 2–3, 2008.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.

ROWLAND, A. et al. Zika virus infection in semen: a call to action and research. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 4, p. 435–437, 5 abr. 2016.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1058–1070, 2006.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly —. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SEPÚLVEDA, C. S. et al. Inhibition of Junin virus RNA synthesis by an antiviral acridone derivative. **Antiviral Research**, v. 93, n. 1, p. 16–22, 2012.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 2017.

SILVA, L. A. et al. A Single-Amino-Acid Polymorphism in Chikungunya Virus E2 Glycoprotein Influences Glycosaminoglycan Utilization. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2385–2397, 2014.

SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Reviews in medical virology**, v. 21, p. 78–88, 2011.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.

STANKIEWICZ-DROGON, A. et al. New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of Hepatitis C virus infection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 8846–8852, 2008.

TEIXEIRA, R. R. et al. Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. **Molecules**, v. 19, p. 8151–8176, 2014.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013.

TSETSARKIN, K. A.; WEAVER, S. C. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by chikungunya virus and its epidemic emergence. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, 2011.

UTT, A. et al. Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. **Journal of virology**, v. 89, n. 6, p. 3145–62, 2015.

VARGHESE, F. S. et al. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. **Antiviral Research**, p. 117–124, 2016.

VEGA-RUA, A. et al. High Level of Vector Competence of Aedes aegypti and Aedes albopictus from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.

VIGILÂNCIA, S. DE. Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 49, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 38, p. 1–10, 2016.

VIGILÂNCIA, S. DE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 33, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. Tabela 2, p. 1–13, 2017.

VIJAYAN, P. et al. The Cytotoxic Activity of the Total Alkaloids Isolated from Different Parts of Solanum pseudocapsicum. **The New England journal of medicine**, v. 371, p. 885–887, 2014.

WANSI, J. D. et al. **Alkaloids from the Medicinal Plants of Africa**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013.

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, 2015.

WINTACHAI, P. et al. Identification of Prohibitin as a Chikungunya Virus Receptor Protein. **Journal of Medical Virology**, v. 84, p. 1757–1770, 2012.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S441–S445, 2016.

ZARUBAEV, V. V et al. Direct antiviral effect of cycloferon (10-carboxymethyl-9- acridanone) against adenovirus type 6 in vitro. **Antiviral Research**, v. 58, p. 131–137, 2003.

ZIDAR, N. et al. Antimicrobial activity of the marine alkaloids, clathrocin and oroidin, and their synthetic analogues. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 940–963, 2014.