

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Lucca Rocha Policastro

**ENSAIOS CELULARES BASEADOS EM REPLICON DE CHIKUNGUNYA PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ANTIVIRAIS**

São Carlos – SP

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Lucca Rocha Policastro

**ENSAIOS CELULARES BASEADOS EM REPLICON DE CHIKUNGUNYA PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ANTIVIRAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado junto à Universidade Federal
de São Carlos como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rafaela Sachetto
Fernandes
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda de
Freitas Anibal

São Carlos - SP

2022

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Andreia, pelo seu papel fundamental, desde o início, em minha educação.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço imensamente minha orientadora, Rafaela Sachetto Fernandes, que confiou a mim o projeto do replicon de vírus Chikungunya e cujo suporte constante, atenção, cobrança e paciência foram indispensáveis, tanto para a realização deste trabalho, quanto para meu desenvolvimento como cientista. Agradeço também o apoio da minha co-orientadora, Fernanda de Freitas Anibal, e do meu orientador de iniciação científica, Glaucius Oliva.

Agradeço à minha mãe, Andreia Campos da Rocha, e ao meu pai, Renato Godinho Policastro, que sempre me amaram e acreditaram em mim, até mais do que eu mesmo, me impulsionando para os melhores caminhos e me apoiando em todas as jornadas.

Agradeço aos colegas da turma 018 do curso de biotecnologia, especialmente ao Vinicius Cauan Mendes da Silva, ao Giovanni de Oliveira Conceição, à Ellen de Sousa Silva, ao Wesley dos Santos Silva, ao João Pedro da Cruz Rosário, à Maria Júlia Mattos Gomes e à Jaiane Santana da Paz, que estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos e me ajudaram a crescer. Sou grato também a todas as amizades que fiz em São Carlos e aos professores que me ensinaram e serviram de modelo para mim.

Agradeço aos colegas de laboratório, principalmente Isabela Dolci, André Schutzer de Godoy e Gabriela Dias Noske, por toda a ajuda e companhia dentro e fora da minha pesquisa. Agradeço também à Profa. Laura Helena Vega Gonzales Gil pela montagem do sistema replicon utilizado e à Profa. Ana Carolina Gomes Jardim pela colaboração nos ensaios de infecção viral.

Por fim, agradeço à FAPESP pela bolsa de iniciação científica (projeto 2021/01706-0), vinculada ao CEPID FAPESP 2013/07600-3, que possibilitou a realização deste trabalho. Agradeço também ao *Medicines for Malaria Venture/ Drugs for Neglected Diseases initiative* (MMV/DNDi) pela disponibilização das bibliotecas de compostos aqui utilizadas.

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV), causador da febre Chikungunya, é um arbovírus transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*, que periodicamente provoca epidemias ao redor do mundo, podendo se tornar um sério problema de saúde pública. Entretanto, não existem vacinas ou fármacos aprovados contra o CHIKV. Portanto, é fundamental a pesquisa para identificação de antivirais, a qual pode ser realizada de maneira rápida e eficiente por ensaios em modo de triagem de alta performance (*high-throughput screening*, HTS), como os ensaios baseados em replicon. Estes são sistemas subgenômicos nos quais os genes codificadores das proteínas estruturais são substituídos por um gene repórter, permitindo a identificação de inibidores da replicação viral medindo-se a atividade da proteína repórter, de maneira mais fácil e segura do que os métodos tradicionais. Neste estudo, foi utilizada a linhagem replicon repórter de CHIKV que contém o gene da *Gaussia luciferase* (GLuc) como repórter, denominada BHK-21-Rep-T7-GLuc-nSP-CHIKV-99650, para a triagem de três bibliotecas de pequenas moléculas do MMV/DNDi. Através dos ensaios baseados em replicon foi possível identificar 4 compostos, Itraconazol, GSK-983, Rubitecan e MMV676270, como inibidores da replicação do CHIKV com baixa a moderada toxicidade. Duas destas moléculas, o antifúngico Itraconazol e o antiviral Rubitecan, foram as mais promissoras com índices de seletividade >312,5 e >714,3, respectivamente, valores consideravelmente maiores do que o observado para os demais. Além disso, a inibição da replicação foi confirmada pela diminuição da expressão relativa do RNA replicon em células tratadas com as concentrações efetivas dos 4 compostos. Para melhor caracterizar atividade destas moléculas contra o CHIKV, ensaios de infecção viral serão realizados em colaboração com a Profa. Ana Carolina Jardim da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Palavras-chave: Chikungunya, *alfavírus*, arbovirose, replicon, ensaios celulares, descoberta de drogas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Organização estrutural do genoma do CHIKV.....	10
Figura 2 — Representação esquemática da estrutura do replicon presente na linhagem BHK-21-Rep-T7-GLuc-nSP- CHIKV-99650 (A) e do seu funcionamento a partir da transfecção (B).	12
Figura 3 — Curvas de efetividade (EC_{50}) e citotoxicidade (CC_{50}) da Suramina.....	19
Figura 4 — HTS antivirais para a PRB, COVID Box e Pathogen Box.	20
Figura 5 — Curvas concentração-efeito do Itraconazol (A e B), GSK-983 (C e D), Rubitecan (E e F) e MMV676270 (G e H).	22
Figura 6 — Análise por RT-qPCR da redução na expressão relativa do RNA replicon em células tratadas com ITZ, GSK-983, Rubitecan e MMV676270.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Parâmetros de EC50, CC50 e IS dos compostos avaliados.....	23
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Epidemiologia da febre Chikungunya	9
1.2	Características do CHIKV	10
1.3	O sistema replicon para a descoberta de agentes anti-CHIKV.....	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Bibliotecas de compostos.....	15
3.2	Linhagem replicon repórter de CHIKV.....	15
3.3	Validação dos ensaios baseados em replicon	15
3.4	Ensaio HTS antivirais.....	16
3.4.1	Atividade da GLuc.....	16
3.4.2	Citotoxicidade.....	16
3.5	Determinação das curvas concentração-efeito (EC ₅₀ e CC ₅₀).....	17
3.6	RT-qPCR.....	17
4	RESULTADOS	19
4.1	Determinação das concentrações efetivas e citotóxicas da Suramina	19
4.2	Ensaio HTS antivirais das bibliotecas do MMV/DNDi	19
4.3	Curvas de efetividade e citotoxicidade dos compostos selecionados	20
4.4	Análise por RT-qPCR da expressão relativa do RNA replicon em células tratadas com os inibidores.....	23
5	DISCUSSÃO	25
6	CONCLUSÃO	27
7	PERSPECTIVAS	28
8	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da febre Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus (vírus transmitido por vetor artrópode) responsável por surtos periódicos e explosivos de febre Chikungunya. Foi reportado pela primeira vez em 1952, na Tanzânia, após ser isolado de paciente durante um surto de uma doença causadora de artrite debilitante (MASON; HADDOW, 1957). A partir dos primeiros casos na África, na década de 1950, subsequentes epidemias de CHIKV ocorreram durante a última metade do século 20, em países da Ásia e África subsaariana (POWERS et al., 2000). Em dezembro de 2013, o vírus emergiu no continente americano, na Ilha de São Martinho, e espalhou-se para diversos países, incluindo o Brasil (WAHID et al., 2017), embora já houvesse um primeiro caso de infecção reportado no Rio de Janeiro, em 2010 (DE ALBUQUERQUE et al., 2012). Desde o surto no país, em 2014, o número de casos de infecção pelo CHIKV vêm aumentando, podendo se tornar um sério problema de saúde pública, juntamente com as arboviroses endêmicas dengue e febre Zika (RODRIGUES et al., 2020).

As epidemias de CHIKV resultam da passagem do ciclo silvático e rural do vírus para o ciclo urbano, a cada 5 a 20 anos, aproximadamente (VAIRO et al., 2019). O ciclo urbano destaca-se por ter como vetores os mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *A. albopictus*, ambos amplamente disseminados em regiões tropicais e subtropicais, o que facilita a endemicidade da febre Chikungunya nessas áreas (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014). Os principais sintomas desta doença são similares aos de outras arboviroses, variando, conforme a viremia e o estágio de evolução, entre febre, dor de cabeça e mialgia até problemas severos nos tendões/articulações e edema. O CHIKV também afeta o sistema nervoso central e relaciona-se com diferentes casos de distúrbios neurológicos como encefalite, síndrome de Guillain-Barré e polineuropatia (MELLO et al., 2020).

Atualmente, não existem vacinas ou fármacos específicos aprovados contra o CHIKV. No momento, há uma vacina de vírus atenuado desenvolvida pela austríaca Valneva em colaboração com o Instituto Butantã em ensaios clínicos de fase III, cujos dados ainda não foram publicados (WRESSNIGG et al., 2020). As medidas de profilaxia se baseiam no controle dos vetores, o que têm demonstrado um limitado

sucesso na contenção do vírus. Portanto, há uma grande necessidade de se desenvolver tratamentos seguros e eficazes contra o CHIKV visando mitigar a disseminação viral e limitar a morbidade associada à doença (SILVA; DERMODY, 2017).

1.2 Características do CHIKV

O CHIKV pertence ao gênero *Alfavirus* da família *Togaviridae*. É um vírus envelopado que apresenta um genoma de RNA fita simples positivo com cerca de 12 kb, contendo duas fases abertas de leitura (*Open reading frames, ORFs*) separadas por uma junção não-codificadora. O genoma viral codifica para 4 proteínas não-estruturais (nsP1-4) e 5 estruturais (C, E3, E2, 6K e E1). Também possui uma extremidade 5' capeada (7-metilguanossina) e uma extremidade 3' poliadenilada (BURT et al., 2017). Um esquema do genoma do CHIKV está representado na Figura 1.

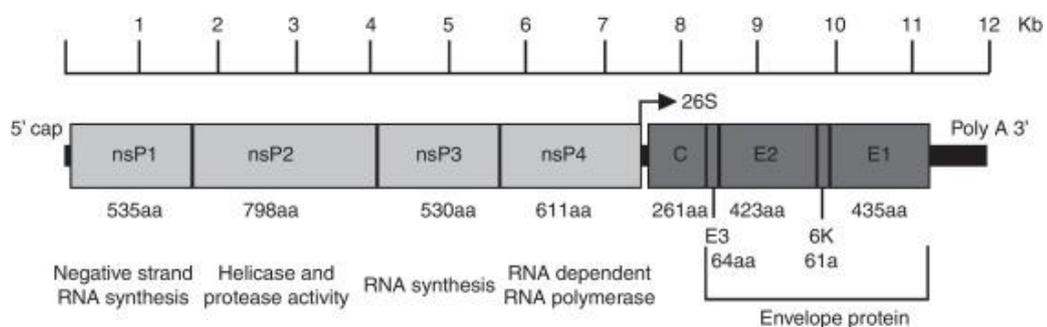


Figura 1 — Organização estrutural do genoma do CHIKV. O RNA fita simples positivo contém um cap na extremidade 5', 4 genes não-estruturais (nsP1-4), 5 genes estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) e uma cauda poliA na extremidade 3'. Fonte: adaptado de (GALÁN-HUERTA et al., 2015).

As proteínas não-estruturais (nsPs) são codificadas por 2/3 do genoma da região 5' e traduzidas como uma poliproteína precursora, nsP1234, a qual é clivada pela atividade de protease da nsP2. Além de protease, as nsPs realizam outras atividades necessárias à replicação, como a de metil e guaniltransferase para capeamento do RNA (nsP1), de helicase (nsP2) e de RNA polimerase RNA dependente (nsP4) (CARISSIMO; NG, 2019). A nsP3 foi, dentre essas, a que levou mais tempo para ser entendida, mas, trabalhos recentes apontam sua função crucial na mediação das interações entre proteínas do vírus e do hospedeiro (GÖTTE; LIU; MCINERNEY, 2018). A ORF 3' é traduzida a partir de um RNA mensageiro

subgenômico positivo e codifica as proteínas estruturais do vírus, incluindo as três proteínas majoritárias E1, E2 e E3, que formam as espículas do envelope viral. A proteína C forma o nucleocapsídeo icosaédrico e a proteína 6K atua como viroporina (BURT et al., 2017).

1.3 O sistema replicon para a descoberta de agentes anti-CHIKV

O replicon é um sistema subgenômico autorreplicante, no qual são mantidos todos os elementos necessários para a replicação do RNA viral, porém, os genes que codificam as proteínas estruturais do vírus são substituídos por um gene repórter, como uma luciferase ou uma proteína fluorescente. Os efeitos inibitórios dos compostos na replicação do RNA viral podem ser facilmente avaliados medindo-se a redução dos sinais luminescentes ou fluorescentes (FERNANDES et al., 2020; KÜMMERER, 2018) (Figura 2). Além disso, o replicon pode ser mantido de forma estável nas células através da introdução de um gene de resistência à droga neste sistema, como o gene da neomicina fosfotransferase (Neo) ou da puromicina acetiltransferase (Pac) (LI et al., 2018). Como não há formação de novos vírions, os replicons não geram partículas infecciosas, eliminando, assim, o risco de infecção adquirida em laboratório (XIE et al., 2016).

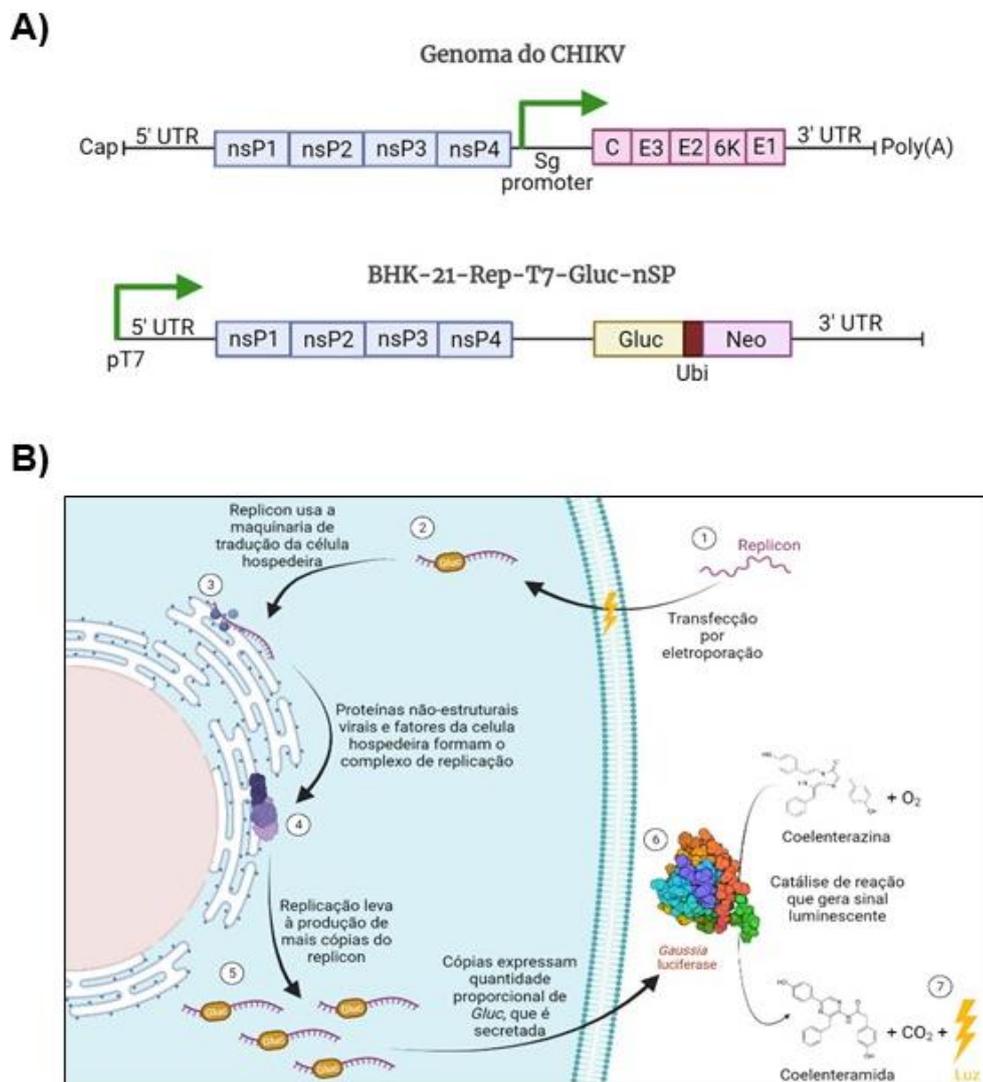


Figura 2 — Representação esquemática da estrutura do replicon presente na linhagem BHK-21-Rep-T7-GLuc-nSP- CHIKV-99650 (A) e do seu funcionamento a partir da transfecção (B). Em A, nota-se que o replicon, controlado por um promotor constitutivo de fago T7, preserva os genes que codificam as nsPs do genoma do CHIKV, mas tem os genes que codificam proteínas estruturais substituídos pelo gene da *Gaussia luciferase* (GLuc) e da neomicina fosfotransferase (Neo), separados por um sítio de ubiquitinação. Em B, é mostrado como o sistema usa as nsPs para a produção de mais cópias, sem produzir novos vírions, além de expressar a GLuc, catalisadora de uma reação que gera sinais luminescentes, os quais se relacionam com os níveis de RNA replicon acumulados. Dessa forma, é possível avaliar a eficácia de replicação dos replicons pela medição desta luminescência. Fonte: criado pelo próprio autor com BioRender.com.

Uma vez transfectados em células de mamíferos suscetíveis, os sistemas replicon permitem realizar uma triagem de alto rendimento (*high-throughput screening*, HTS) rápida e eficiente de moléculas que inibem a replicação viral (HANNEMANN, 2020). Apesar de serem necessárias modificações genéticas na sequência do genoma viral, os replicons são instrumentos seguros e confiáveis para a triagem de grandes bibliotecas de compostos, além de fornecerem uma alternativa para ensaios com vírus de difícil cultivo (FERNANDES et al., 2020). A triagem HTS é

uma enorme vantagem em relação os ensaios antivirais tradicionais, que são de natureza de baixo rendimento e limitam-se à infecção viral de células em cultura e ao monitoramento dos efeitos citopáticos ou quantificação do RNA viral por RT-PCR (LO; TILGNER; SHI, 2003). Replicons subgenômicos de CHIKV já foram utilizados em testes *in vitro* para descoberta de compostos inibidores da replicação viral, dentre eles silimarina, abamectina, ivermectina e berberina (LANI et al., 2015; VARGHESE et al., 2016), demonstrando a eficácia dessa tecnologia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi a utilização da linhagem replicon repórter de CHIKV, denominada BHK-21-Rep-T7-GLuc-nSP-CHIKV-99650, para a triagem HTS de três bibliotecas de pequenas moléculas do MMV/DNDi (*Medicines for Malaria Venture/ Drugs for Neglected Diseases initiative*), visando identificar potenciais inibidores da replicação viral.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar a inibição da replicação viral pelos compostos das bibliotecas testadas, através da atividade da proteína repórter (GLuc).
- II. Determinar os parâmetros farmacodinâmicos de EC₅₀ (potência) e de CC₅₀ (citotoxicidade) para os compostos selecionados.
- III. Confirmar a inibição da replicação viral através da diminuição da expressão relativa do RNA replicon por RT-qPCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bibliotecas de compostos

As bibliotecas utilizadas nos ensaios foram a *Pandemic Response Box* (PRB) (400 moléculas dispostas em 5 placas de 96 poços – Placas A-E), a *Pathogen Box* (400 moléculas dispostas em 5 placas de 96 poços – Placas A-E) e a *COVID Box* (160 moléculas dispostas em 2 placas de 96 poços – Placas A e B) do MMV/DNDi. Para os ensaios, os compostos ($\geq 90\%$ de pureza) a 10 mM em DMSO 100% (v/v) foram diluídos no sobrenadante celular para um volume final de 1% (v/v) de DMSO.

3.2 Linhagem replicon repórter de CHIKV

Neste trabalho, foi utilizada a linhagem BHK-21-Rep-T7-GLuc-nSP-CHIKV-99650, que expressa a *Gaussia* luciferase (GLuc) como proteína repórter, além da neomicina fosfotransferase, que permite a manutenção do sistema nas células de forma estável. A GLuc tem como vantagem ser secretada pela célula, não havendo necessidade de lise para a análise da sua atividade. Essas células foram obtidas em colaboração com grupo da Profa. Dra. Laura Helena V. G. Gil, do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-Fiocruz). A construção do sistema foi baseada no genoma do CHIKV linhagem 99659 (GenBank KJ451624.1), e está sob controle do promotor T7 para a transcrição *in vitro* do RNA replicon.

3.3 Validação dos ensaios baseados em replicon

A validação dos ensaios com a linhagem replicon repórter BHK-21-Rep-T7-GLuc-nSP-CHIKV-99650 foi realizada com o fármaco antiparasitário Suramina, um inibidor já conhecido do CHIKV (ALBULESCU et al., 2020). As células replicon foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e G418 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a 37 °C sob atmosfera de 5% CO_2 . Após atingirem 70-90% de confluência, essas células foram tripsinizadas e centrifugadas a 125 x *g* por 5 min. Em seguida, foram ressuspensas em meio DMEM 10% SFB e ajustadas para 2×10^4 células em 100 μL /poço de placas de 96 poços transparentes (KASVI). As placas foram incubadas a 37 °C e 5% CO_2 por 16 h. Posteriormente, o meio foi

substituído por DMEM 2% SFB para evitar a interação dos compostos com o soro (Xuping Xie et al., 2016) e a Suramina foi adicionada em diluição seriada fator 2 (50 μ L a 0,09 μ L). Após 48 horas de incubação, foram transferidos 40 μ L do sobrenadante das células para placas brancas opacas (Corning) contendo 50 μ L/poço do tampão de reação (substrato + tampão de ensaio) do kit *Renilla* luciferase Assay System (Promega). A atividade da GLuc foi medida no equipamento SpectraMax i3 Multi-mode Detection Platform (Molecular Devices). A citotoxicidade da Suramina foi determinada por ensaio de proliferação celular com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (FERNANDES et al., 2021). Após a incubação com os compostos, foi adicionada solução MTT (5 mg/mL) a 1/10 do volume dos poços (6 μ L/poço) e as placas foram incubadas na estufa de CO₂ a 37 °C por 2 a 4 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 μ L de DMSO aos poços da placa para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm no SpectraMax 384 plate reader (Molecular Devices). Células em 1% DMSO foram utilizadas como controle. As concentrações do fármaco necessárias para inibição de 50% da atividade da GLuc (EC₅₀) e para inibição de 50% da proliferação celular (CC₅₀) foram estimadas através do software OriginPro 9.0 (Origin Lab). Foram realizados dois ensaios independentes em duplicata.

3.4 Ensaios HTS antivirais

3.4.1 Atividade da GLuc

Para estes ensaios, aproximadamente 2×10^4 células por poço foram semeadas em placas de 96 poços transparente (KASVI) e incubadas a 37 C 5% CO₂ por 16 h. Em seguida, o meio foi substituído por DMEM 2% SFB e os compostos das bibliotecas do MMV/DNDi foram então adicionados a 10 μ M de concentração e as placas foram incubadas na estufa de CO₂ a 37 °C. Após 48 h, a atividade da Gluc foi avaliada conforme descrito no item 3.3.

3.4.2 Citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade, foi realizado o ensaio de MTT descrito no item 3.3. Após a incubação com os compostos a 10 μ M, foi adicionada

solução MTT (5 mg/mL) a 1/10 do volume dos poços (6 µL/poço) e as placas foram incubadas na estufa de CO₂ a 37 °C por 2 a 4 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de DMSO aos poços da placa para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm no SpectraMax 384 plate reader (Molecular Devices). Células em 1% DMSO foram utilizadas como controle.

3.5 Determinação das curvas concentração-efeito (EC₅₀ e CC₅₀)

Os compostos que inibiram a atividade da GLuc em ≥ 80% e não se mostraram tóxicos para as células replicon (viabilidade celular acima de 80%) foram avaliados de maneira dose-dependente. Aproximadamente 2 x 10⁴ células por poço foram semeadas em meio DMEM 10% SFB em placas de 96 poços (KASVI) transparentes e incubadas por 16 h a 37 °C 5% CO₂. Em seguida, o sobrenadante das placas foi descartado e foram adicionados 100 µL de DMEM 2% SFB por poço. Os compostos selecionados foram adicionados aos poços das placas em duplicata, em diluição seriada (fator 2 ou fator 5, dependendo da concentração inicial) e então as placas foram incubadas a 37 °C 5% CO₂.

Para determinar a EC₅₀, após 48 h, o sobrenadante da placa foi transferido para uma placa branca, conforme descrito no item 3.3, e a leitura da luminescência foi realizada no equipamento SpectraMax i3 Multi-mode Detection Platform (Molecular Devices). Já para a CC₅₀, foi realizado o ensaio de MTT, conforme descrito no item 3.3. As concentrações de composto capazes de inibir 50% da atividade da GLuc (EC₅₀) e causar 50% da citotoxicidade (CC₅₀), respectivamente, foram determinadas no software OriginPro 9.0 (Origin Lab). Foram feitas duas réplicas experimentais em duplicata para cada ensaio.

3.6 RT-qPCR

Para avaliar a expressão relativa do RNA replicon nas células tratadas com os compostos selecionados no HTS, foi realizada RT-qPCR. Aproximadamente 3 x 10⁵ células por poço foram semeadas em 1 mL de meio DMEM 10% SFB em placa de 6 poços (KASVI) e incubadas por 16 h a 37 °C 5% CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e substituído por meio DMEM 2% SFB. Foram então

adicionados os compostos nas concentrações efetivas (EC_{50}), e a placa foi incubada por 48 h a 37 °C 5% CO_2 . O RNA foi então extraído das células utilizando o Total RNA Purification Kit (Cellco Biotec). O RNA purificado passou por uma etapa de remoção de DNA utilizando 2 μ L de DNase I (Jena Bioscience) à 37 °C por 20 min. Posteriormente, 10 ng deste RNA foram usados como molde para a síntese de cDNA com o kit SCRIPT cDNA synthesis (Jena Bioscience), utilizando os seguintes primers desenhados para o gene da nsP1 (amplicon de 389 pb): Fw – GTTCTCGCATCTAGCCATAAAAC; Rv – CTCGGACTCCTTTAATCGC.

Em seguida, foi realizada a qPCR usando 2 μ L do cDNA obtido pela transcrição reversa como molde, junto dos mesmos primers supracitados, por meio do kit qPCR GreenMaster low Rox (Cellco Biotec). A amplificação consistiu em uma etapa inicial de 95 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s. O ensaio foi realizado em triplicata. A amplificação do RNA replicon foi quantificada para todos os tratamentos em relação ao controle negativo (1% DMSO, nível de expressão equivalente a 1). Estes dados foram analisados estatisticamente por ANOVA fator único e teste de Tukey no software OriginPro 9.0 (Origin Lab).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação das concentrações efetivas e citotóxicas da Suramina

Para controle positivo dos ensaios, avaliamos o uso da Suramina, já reportada como inibidor da replicação do CHIKV (ALBULESCU et al., 2020), através da determinação de suas curvas de efetividade (EC_{50}) e citotoxicidade (CC_{50}) (Figura 3).

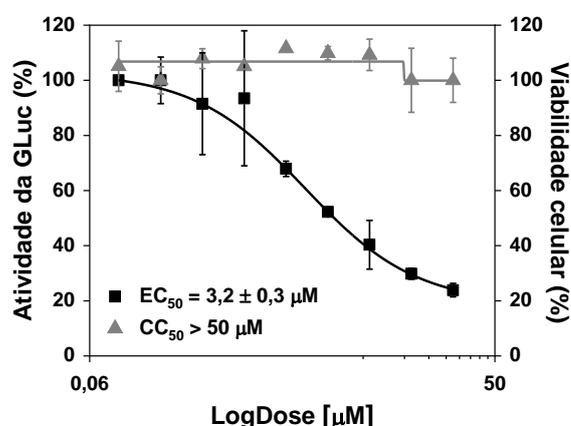


Figura 3 — Curvas de efetividade (EC_{50}) e citotoxicidade (CC_{50}) da Suramina. Os gráficos representam a média e o desvio padrão de dois ensaios independentes realizados em duplicata. As barras de erro representam os desvios-padrão. Fonte: elaborado pelo autor.

O EC_{50} da Suramina foi determinado em $3,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$, similar ao que foi descrito por Albulescu e colaboradores (2015) usando um ensaio *in vitro* com o complexo de replicação de CHIKV isolado de células tranfectadas com o replicon viral (EC_{50} de $6,7 \mu\text{M}$) (ALBULESCU et al., 2015). Além disso, o composto não foi tóxico na máxima concentração testada ($50 \mu\text{M}$). Dessa forma, a Suramina foi utilizada nos ensaios HTS como controle positivo (100% de inibição) da atividade da GLuc.

4.2 Ensaios HTS antivirais das bibliotecas do MMV/DNDi

Em um primeiro momento, foram analisados os compostos das 3 bibliotecas do MMV/DNDi em ponto único a $10 \mu\text{M}$ 1% DMSO em placas de 96 poços. Os dados foram relatados como um logaritmo da porcentagem de inibição em relação aos controles 1% DMSO (negativo, 0% de inibição) e Suramina (positivo, 100% de inibição) (Figura 4).

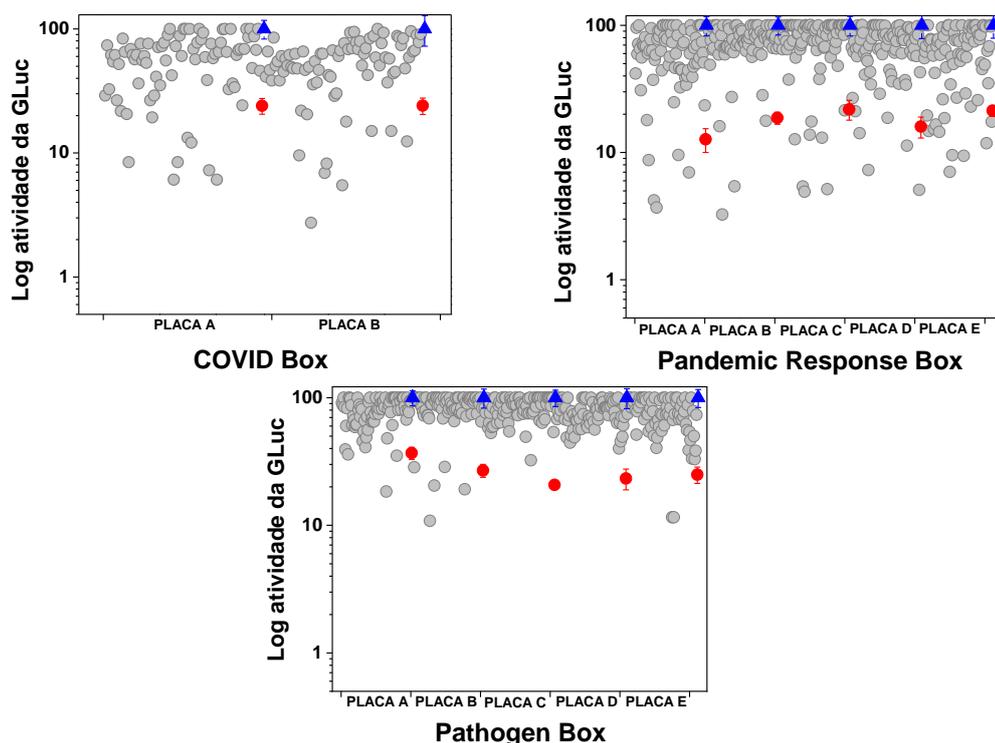


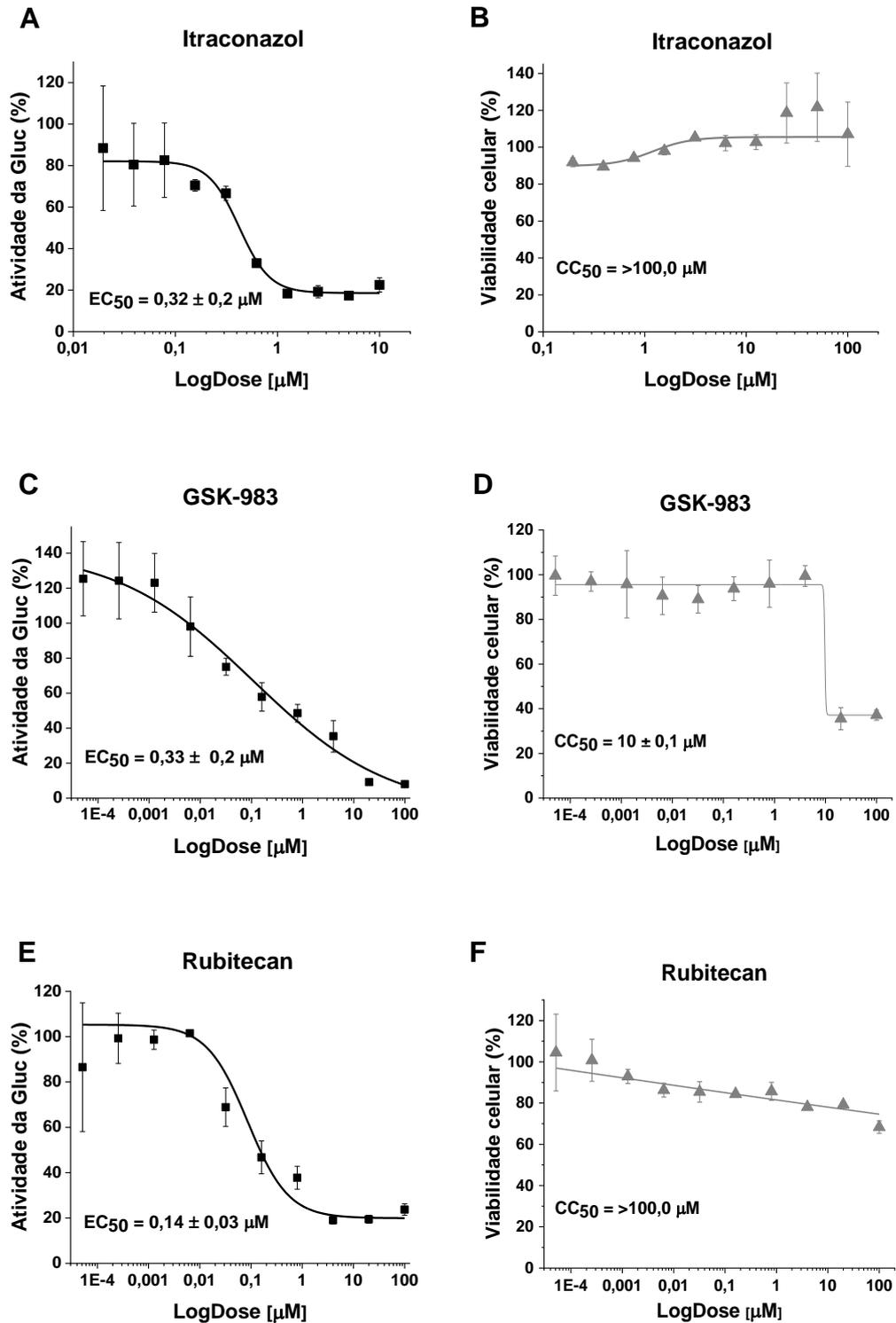
Figura 4 — HTS antivirais para a PRB, COVID Box e Pathogen Box. Gráfico de dispersão para resultados de triagem dos 400 compostos das 5 placas de 96 poços (Placa A a E) da PRB, 160 compostos das 2 placas de 96 poços (Placa A e B) da COVID Box e 400 compostos das 5 placas de 96 poços (Placa A a E) da Pathogen Box: No eixo y, a atividade GLuc relativa para os compostos testados à 10 μ M (cinza claro), controle negativo 1% DMSO (azul) e controle positivo Suramina à 10 μ M (vermelho). Os valores relativos de GLuc são mostrados em escala logarítmica para clareza. Fonte: elaborado pelo autor.

Para excluir resultados falso-positivos que afetam negativamente a viabilidade celular (FERNANDES et al., 2020), os compostos que mostraram inibição superior a 80% foram testados quanto à sua citotoxicidade também à 10 μ M. Para a COVID Box, foram encontradas 4 moléculas com inibição \geq 80% da atividade da luciferase e que resultaram em viabilidade celular \geq 80%. Para a PRB, foram encontradas 3 moléculas, sendo uma delas a tomatidina, já descrita como inibidora da replicação do vírus Chikungunya em ensaios *in vitro* (TROOST et al., 2020). Já para a Pathogen Box, 3 moléculas atenderam aos requisitos. As 9 moléculas selecionadas foram, então, avaliadas de forma dose-dependente.

4.3 Curvas de efetividade e citotoxicidade dos compostos selecionados

Os compostos selecionados pelo HTS tiveram suas curvas concentração-efeito (EC_{50} e CC_{50}) determinadas. Todavia, 5 dentre os 9 compostos

selecionados não exibiram atividade dose-dependente. O Itraconazol (ITZ) da COVID Box foi avaliado em diluição seriada fator 2 (10 μM a 0,02 μM) enquanto os compostos GSK-983 e Rubitecan da PRB e o composto MMV676270 da Pathogen Box foram avaliados em diluições seriadas fator 5 (100 μM a $5,1 \times 10^{-5}$ μM) (Figura 5).



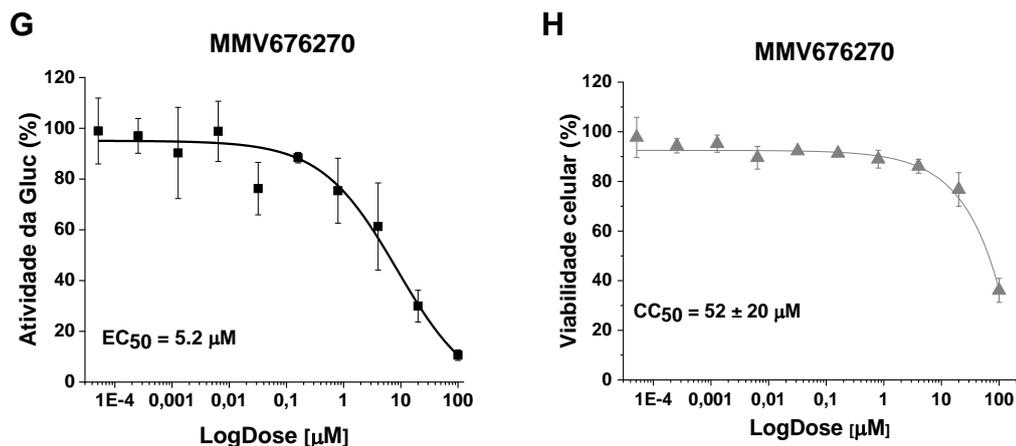
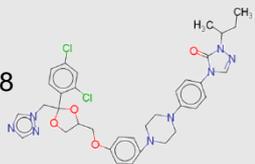
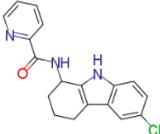
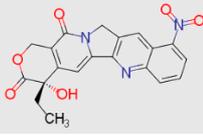
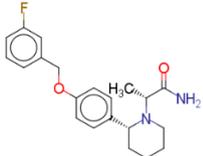


Figura 5 — Curvas concentração-efeito do Itraconazol (A e B), GSK-983 (C e D), Rubitecan (E e F) e MMV676270 (G e H). As células replicon de CHIKV foram incubadas com os compostos em diluições seriadas fator 2 (10 a 0,02 μM) ou fator 5 (100 a $5,1 \times 10^{-5}$ μM) por 48 h e foram realizados os ensaios de atividade da GLuc e MTT. O gráfico representa dois ensaios individuais realizados em duplicata. As barras de erro representam os desvios-padrão. Fonte: elaborado pelo autor.

A partir dos valores determinados de EC_{50} e CC_{50} , foram calculados os índices de seletividade ($IS = CC_{50} / EC_{50}$) para cada composto (Tabela 1). Os quatro compostos resultaram em concentrações efetivas (EC_{50}) na faixa de nano a baixo micromolar. Além disso, o antifúngico Itraconazol e o antiviral Rubitecan não foram tóxicos para as células em concentrações de até 100 μM , resultando em altos índices de seletividade, de respectivamente $> 312,5$ e $> 714,3$. Já o antiviral GSK-983 e o antimalárico sem nome comercial MMV676270, demonstraram moderada toxicidade, o que resultou nos respectivos valores de IS, de 30,3 e 10 (Tabela 1).

Tabela 1 — Parâmetros de EC₅₀, CC₅₀ e IS dos compostos avaliados. Fonte: elaborado pelo autor.

Composto	Estrutura	Classificação	Nome	EC ₅₀	CC ₅₀	IS
MMV637528		Antifúngico	Itraconazol	0,32 ± 0,2 µM	>100 µM	>312,5
MMV690621		Antiviral	GSK-983	0,33 ± 0,2 µM	10 ± 0,1 µM	30,3
MMV1580796		Antiviral	Rubitecan	0,14 ± 0,03 µM	>100 µM	>714,3
MMV676270		Antimalárico	-	5,2 ± 1 µM	52 ± 20 µM	10

4.4 Análise por RT-qPCR da expressão relativa do RNA replicon em células tratadas com os inibidores

Para confirmar a atividade dos compostos na replicação do replicon, foi realizado o ensaio de RT-qPCR com as concentrações efetivas (EC₅₀) do Itraconazol, Rubitecan, GSK-983 e MMV676270 (respectivamente 0,32, 0,33, 0,14 e 5,2 µM). Através da análise da expressão de RNA replicon nas células tratadas em relação ao controle DMSO 1% nota-se uma inibição muito próxima de 50%, como esperado, para o ITZ (47%), GSK-983 (51%) e Rubitecan (44%). Para o MMV676270, a inibição foi ainda maior que a esperada, de 83% (Figura 6).

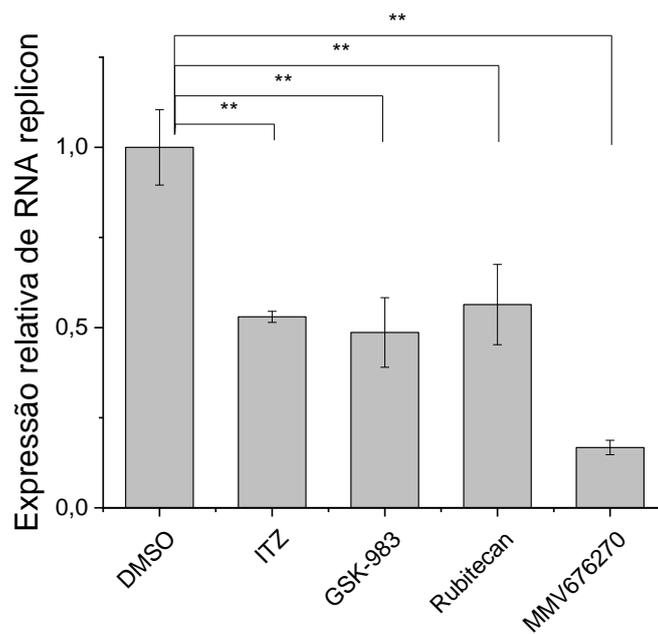


Figura 6 — Análise por RT-qPCR da redução na expressão relativa do RNA replicon em células tratadas com ITZ, GSK-983, Rubitecan e MMV676270. Os quatro compostos foram testados em sua concentração efetiva (EC_{50}) e são mostrados em relação à expressão do controle 1% DMSO. ** $p < 0,01$.
Fonte: elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Apesar do potencial do CHIKV de se espalhar e causar novos surtos, ainda não existe tratamento para a infecção viral, o que justifica a urgência em se desenvolver antivirais específicos (SILVA; DERMODY, 2017). Neste projeto, utilizamos a linhagem replicon BHK-21-Rep-T7-GLuc-nSP-CHIKV-99650 para testar três bibliotecas de pequenas moléculas do MMV/DNDi, na busca por inibidores da replicação do CHIKV. As bibliotecas COVID *Box*, *PRB* e *Pathogen Box* contém compostos comerciais ou em fase de desenvolvimento, com atividades antifúngicas, antivirais ou antimicrobianas. Os ensaios baseados em replicon em formato HTS permitiram identificar, dentre as 960 moléculas avaliadas, 4 capazes de inibir a replicação do replicon de CHIKV, com duas delas, o antifúngico Itraconazol (ITZ) e o antiviral Rubitecan, resultando em altos índices de seletividade (>312,5 e >714,3, respectivamente).

Dentre estes, o ITZ se destaca por ser um fármaco já bem descrito e amplamente empregado no tratamento de micoses. Seu mecanismo de ação se dá, principalmente, pela inibição do citocromo P450 fúngico, responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, que por sua vez é um componente essencial da membrana celular de fungos. Por ser um fármaco já comercializado, o ITZ é um alvo interessante para a estratégia de reposicionamento de fármacos, que consiste na identificação de novos usos para drogas fora de seu escopo original (PUSHPAKOM et al., 2018). Recentemente, o ITZ e seu análogo estrutural, Posaconazol (PCZ), foram identificados como inibidores potentes da replicação de membros do gênero *Alphavirus*. Apenas o PCZ foi testado diretamente contra o CHIKV, apresentando EC₅₀ de 1,4 µM em células BHK-21 (VARGHESE et al., 2022). Esse trabalho parece ir ao encontro dos resultados do ensaio replicon, em que o ITZ se mostra um potente inibidor da replicação de CHIKV, com EC₅₀ de 0,33 µM.

Por sua vez, o Rubitecan é um análogo da camptotecina (CPT) usado como antitumoral (CLARK, 2006). Apesar de não aprovado para o uso clínico, o composto tem resultados promissores em estudos de fase I, II e III para diferentes tipos de câncer e apresenta uma vantagem em relação à outros análogos de CPT que é a administração por via oral (CLARK, 2006). O alvo primário da CPT é a topoisomerase I, responsável por introduzir quebras de fita única que aliviam a torção do DNA para a replicação e a transcrição (PANTAZIS et al., 1999). A topoisomerase I

é importante para a replicação em vírus de DNA, o que justifica o estudo da CPT contra estes patógenos. A atividade antiviral do Rubitecan foi avaliada contra o HIV, demonstrando inibição da replicação viral *in vitro*, com EC₅₀ em cerca de 3 nM (SADAIE; MAYNER; DONIGER, 2004). Entretanto, a atividade do composto contra o CHIKV ainda precisa ser avaliada.

Outro antiviral identificado foi o GSK-983, um tetrahydrocarbazol com atividade antiviral de amplo espectro (HARVEY et al., 2009). Assim como outros compostos da mesma classe, seu alvo é a diidroorotato desidrogenase (DHODH), parte da via de biossíntese *de novo* de pirimidinas. Ao inibir essa enzima, a molécula ativa a resposta da imunidade inata através da proteína ATM (ataxia-telangiectasia mutada) e do IRF-1 (fator regulatório de interferon tipo I) contra vírus como o Ebola (COELHO; OLIVEIRA, 2020). Esse mecanismo de ação é promissor e estudado para outros vírus relevantes, como o SARS-CoV-2 (KAUR et al., 2021).

Por fim, em relação ao composto identificado como MMV676270, não há registros na literatura sobre seu uso, tampouco possíveis mecanismos de ação que ajudariam a entender a atividade contra o CHIKV. Existem apenas dados sobre sua atividade confirmada contra *Plasmodium berghei* e *P. Falciparum*, que parece estar relacionada à inibição da lactato desidrogenase (PUBCHEM, 2022.). Contudo, este mecanismo de ação parece pouco relacionado com o efeito sobre a replicação do CHIKV.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram avançar com a identificação de compostos com atividade contra a replicação de CHIKV em modelo celular expressando replicon repórter. Dois compostos se mostraram muito potentes e promissores, o Itraconazol e o Rubitecan. O primeiro se destaca por ser um antifúngico já comercializado, o que seria interessante para reposicioná-lo como fármaco anti-CHIKV, enquanto o segundo já foi avaliado como antiviral contra HIV demonstrando uma atividade efetiva na faixa de baixo nanomolar. Entretanto, estudos sobre a atividade destas moléculas contra a infecção viral precisam ser abordados para que se possa elucidar o mecanismo de ação de cada uma.

7 PERSPECTIVAS

A fim de continuar o trabalho desenvolvido, a corroboração dos resultados será feita pela avaliação do Itraconazol, Rubitecan, GSK-983 e MMV672770 frente à infecção viral de células BHK-21. Estes ensaios serão feitos em colaboração com o grupo da Profa. Ana Carolina Gomes Jardim, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

8 REFERÊNCIAS

(2R)-2-[(2R)-2-[4-[(3-fluorophenyl)methoxy]phenyl]piperidin-1-yl]propanamide | C21H25FN2O2 - PubChem. [s.d.]. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122196550#section=Biological-Test-Results>. Acesso em: 25 mar. 2022.

ALBULESCU, IC et al. Suramin Inhibits Chikungunya Virus Replication by Interacting with Virions and Blocking the Early Steps of Infection. **Viruses**, [S. l.], v. 12, n. 3, 2020. DOI: 10.3390/V12030314. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32191995/>. Acesso em: 3 set. 2021.

ALBULESCU, Irina C. et al. Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 121, p. 39–46, 2015. DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2015.06.013.

BURT, Felicity J. et al. **Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen***The Lancet Infectious Diseases*Lancet Publishing Group, , 2017. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30385-1.

CARISSIMO, Guillaume; NG, Lisa F. P. Understanding Molecular Pathogenesis with Chikungunya Virus Research Tools. *In*: [s.l.] : Springer, Berlin, Heidelberg, 2019. p. 1–21. DOI: 10.1007/82_2019_158. Disponível em:

https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2019_158. Acesso em: 11 fev. 2021.

CLARK, Jeffrey W. Rubitecan. **Expert opinion on investigational drugs**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 71–79, 2006. DOI: 10.1517/13543784.15.1.71. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16370935/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

COELHO, Ana R.; OLIVEIRA, Paulo J. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 50, n. 10, p. e13366, 2020. DOI: 10.1111/EJC.13366. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/eci.13366>. Acesso em: 20 mar. 2022.

COFFEY, Lark L.; FAILLOUX, Anna Bella; WEAVER, Scott C. **Chikungunya virus–vector interactions***Viruses*MDPI AG, , 2014. DOI: 10.3390/v6114628. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25421891/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

DE ALBUQUERQUE, Isabella Gomes Cavalcanti et al. Infecção pelo vírus Chikungunya: Relato do primeiro caso diagnosticado no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 128–129, 2012. DOI: 10.1590/S0037-86822012000100026. Disponível em: <http://portal.saude.gov>. Acesso em: 11 fev. 2021.

FERNANDES, Rafaela S.; FREIRE, Marjorie C. L. C.; BUENO, Renata V.; GODOY, Andre S.; GIL, Laura H. V. G.; OLIVA, Glaucius. Reporter replicons for antiviral drug discovery against positive single-stranded RNA viruses. **Viruses**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 1–22, 2020. DOI: 10.3390/v12060598.

FERNANDES, Rafaela Sachetto; DE GODOY, Andre Schutzer; SANTOS, Igor Andrade; NOSKE, Gabriela Dias; DE OLIVEIRA, Kettlyn Irene Zagato; GAWRILJUK, Victor Oliveira; GOMES JARDIM, Ana Carolina; OLIVA, Glaucius. Discovery of an imidazonaphthyridine and a rimirinophenazine as potent anti-Zika virus agents through

a replicon-based high-throughput screening. **Virus Research**, [S. l.], v. 299, p. 198388, 2021. DOI: 10.1016/j.virusres.2021.198388. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170221000952>. Acesso em: 19 out. 2021.

GALÁN-HUERTA, K. A.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; FARFAN-ALE, J. A.; RAMOS-JIMÉNEZ, J. Chikungunya virus: A general overview. **Medicina Universitaria**, [S. l.], v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015. DOI: 10.1016/j.rmu.2015.06.001.

GÖTTE, Benjamin; LIU, Lifeng; MCINERNEY, Gerald M. **The enigmatic alphavirus non-structural protein 3 (nsP3) revealing its secrets at last** Viruses MDPI AG, , 2018. DOI: 10.3390/v10030105. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29495654/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

HANNEMANN, Holger. Viral replicons as valuable tools for drug discovery. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 1026–1033, 2020. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.03.010.

HARVEY, Robert et al. GSK983: A novel compound with broad-spectrum antiviral activity. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 1–11, 2009. DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.12.015.

KAUR, Hardeep et al. Efficacy and safety of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors “leflunomide” and “teriflunomide” in Covid-19: A narrative review. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 906, p. 174233, 2021. DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2021.174233.

KÜMMERER, Beate M. Establishment and application of flavivirus replicons. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. [s.l.] : Springer New York LLC, 2018. v. 1062p. 165–173. DOI: 10.1007/978-981-10-8727-1_12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29845532/>. Acesso em: 12 fev. 2021.

LANI, Rafidah et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1038/srep11421. Disponível em: www.nature.com/scientificreports. Acesso em: 12 fev. 2021.

LI, Jia Qi; DENG, Cheng Lin; GU, Dayong; LI, Xiao; SHI, Lei; HE, Jian'an; ZHANG, Qiu Yan; ZHANG, Bo; YE, Han Qing. Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for screening inhibitors of Zika virus. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 150, n. December 2017, p. 148–154, 2018. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.12.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.12.017>.

LO, Michael K.; TILGNER, Mark; SHI, Pei-yong. Potential High-Throughput Assay for Screening Inhibitors of West Nile Virus Replication. [S. l.], v. 77, n. 23, p. 12901–12906, 2003. DOI: 10.1128/JVI.77.23.12901.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 51, n. 3, p. 238–240, 1957. DOI: 10.1016/0035-9203(57)90022-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13443013/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

MELLO, Cíntia da Silva; CABRAL-CASTRO, Mauro Jorge; SILVA DE FARIA, Luiz

Claudio; PERALTA, José Mauro; PUCCIONI-SOHLER, Marzia. Dengue and chikungunya infection in neurologic disorders from endemic areas in Brazil.

Neurology: Clinical Practice, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 497–502, 2020. DOI: 10.1212/cpj.0000000000000776.

PANTAZIS, Panayotis; HAN, Zhiyong; CHATTERJEE, Devasis; WYCHE, James. **Water-insoluble camptothecin analogues as potential antiviral drugs** *Journal of Biomedical Science*, 1999. DOI: 10.1007/BF02256417.

POWERS, Ann M.; BRAULT, Aaron C.; TESH, Robert B.; WEAVER, Scott C. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 471–479, 2000. DOI: 10.1099/0022-1317-81-2-471.

PUSHPAKOM, Sudeep et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery** 2018 18:1, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018. DOI: 10.1038/nrd.2018.168. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd.2018.168>. Acesso em: 15 mar. 2022.

RODRIGUES, Ayslany Melo; SOUZA, Rafael Ribeiro Mota; FONSECA, Larissa Moraes Dos Santos; ROLO, Carolina de Araújo; CARVALHO, Rejane Hughes; SARDI, Silvia Ines; CAMPOS, Gubio Soares. Genomic surveillance of the chikungunya virus (CHIKV) in Northeast Brazil after the first outbreak in 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 53, p. 1–6, 2020. DOI: 10.1590/0037-8682-0583-2019.

SADAIE, M. Reza; MAYNER, Ronald; DONIGER, Jay. A novel approach to develop anti-HIV drugs: Adapting non-nucleoside anticancer chemotherapeutics. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 1–18, 2004. DOI: 10.1016/j.antiviral.2003.09.004.

SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. **Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies** *Journal of Clinical Investigation* American Society for Clinical Investigation, , 2017. DOI: 10.1172/JCI84417.

TROOST, Berit; MULDER, Lianne M.; DIOSA-TORO, Mayra; VAN DE POL, Denise; RODENHUIS-ZYBERT, Izabela A.; SMIT, Jolanda M. Tomatidine, a natural steroidal alkaloid shows antiviral activity towards chikungunya virus in vitro. **Scientific reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/S41598-020-63397-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32286447/>. Acesso em: 9 set. 2021.

VAIRO, Francesco; HAIDER, Najmul; KOCK, Richard; NTOUMI, Francine; IPPOLITO, Giuseppe; ZUMLA, Alimuddin. **Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention** *Infectious Disease Clinics of North America* W.B. Saunders, , 2019. DOI: 10.1016/j.idc.2019.08.006.

VARGHESE, Finny S. et al. Posaconazole inhibits multiple steps of the alphavirus replication cycle. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 197, n. September 2021, 2022. DOI: 10.1016/j.antiviral.2021.105223.

VARGHESE, Finny S.; KAUKINEN, Pasi; GLÄSKER, Sabine; BESPALOV, Maxim; HANSKI, Leena; WENNERBERG, Krister; KÜMMERER, Beate M.; AHOLA, Tero. Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya

and other alphaviruses. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 126, p. 117–124, 2016. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.12.012. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26752081/>. Acesso em: 12 fev. 2021.

WAHID, Braira; ALI, Amjad; RAFIQUE, Shazia; IDREES, Muhammad. **Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history***International Journal of Infectious Diseases* Elsevier B.V., , 2017. DOI:

10.1016/j.ijid.2017.03.006. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28288924/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

WRESSNIGG, Nina et al. Single-shot live-attenuated chikungunya vaccine in healthy adults: a phase 1, randomised controlled trial. **The Lancet. Infectious diseases**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 1193–1203, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30238-3.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497524/>. Acesso em: 25 mar. 2022.

XIE, X.; ZOU, J.; SHAN, C.; YANG, Y.; KUM, D. B.; DALLMEIER, K.; NEYTS, J.; SHI, P. Y. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA. Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA College of Animal Science and Technology, Southwe, v. 12, p. 156–160, 2016. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.09.013.