

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ISABELA DOLCI

Triagens de alta performance para a descoberta de agentes anti-Zika vírus.

SÃO CARLOS

2022

ISABELA DOLCI

Triagens de alta performance para a descoberta de agentes anti-Zika vírus.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de bacharelado em biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rafaela Sachetto Fernandes

Coorientadora: Prof^ª. Andrea Soares da Costa Fuentes

SÃO CARLOS

2022

Dedicatória

À minhas irmãs Amanda e Patrícia, e à minha orientadora, Rafaela, dedico todo meu esforço aqui contido.

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe, Maria Helena, por toda sua força, carinho e pela minha vida.

A minha irmã Amanda, por ser o anjo nº 1 da minha vida, que sempre cuidou de mim, me protegeu, me fez crescer, me inspira, incentiva e me ensina a resiliência todos os dias.

A minha irmã Patrícia, meu anjo nº 2, minha referência de bondade e amor, que sempre me inspirou a ser melhor pelo próprio exemplo e sempre me incentivou seja qual fosse minha decisão.

Ao meu cachorrinho Igor, pelo amor incondicional que sempre me acalmou.

Ao meu companheiro Leonardo, por todo suporte emocional e por acreditar em mim sempre.

Aos meus tios Ana e Ricardo, por sempre estarem dispostos a me ajudar, desde sempre.

Ao meu irmão de coração, Danilo Muniz, pela inspiração e apoio.

A todos meus amigos que fizeram esses anos mais leves.

Aos meus professores, todos eles, pelos ensinamentos e inspiração para um dia seguir seus passos nesta profissão. Em especial:

Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes; Prof. Dr. Iran Malavazi; Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti; Prof. Dr. Paulo Lacava; Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius; Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro; Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega.

Ao Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza, que me acolheu em seu laboratório quando eu nem sabia como funcionava um laboratório.

Ao Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, pela orientação que me direcionou até aqui.

A Gabriela Dias Noske, por toda ajuda, ensinamentos e risadas.

Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva, pelo apoio e suporte.

Ao secretário do curso, Rodrigo Roberto Malimpensa, por todo auxílio desde o início.

A Profa Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, por aceitar compor minha banca examinadora e por toda sua solicitude.

A Patrícia Maria Siqueira dos Passos, por ter me inspirado como cientista,

Aos meus colegas de laboratório, Lucca e Lavínia.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo fomento que viabilizou este trabalho.

E principalmente, à minha orientadora, Dra. Rafaela Sachetto Fernandes, por não ter palavras que consigam expressar sua excepcionalidade.

Resumo

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus transmitido pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, que se tornou um problema de saúde pública durante o surto de 2015/2016 nas Américas e principalmente no Brasil, onde foi relacionado aos casos de microcefalia e síndrome de Guillan-Barré. O potencial do vírus em reemergir causando novas epidemias é sempre latente, portanto, a busca por tratamentos efetivos contra a infecção viral se torna necessária, visto que ainda não existem vacinas ou fármacos disponíveis. A identificação de agentes antivirais de forma rápida e eficiente depende de ensaios celulares/bioquímicos que possam ser realizados em modo de triagem de alta performance (*high-throughput screening*, HTS). Neste trabalho, utilizamos duas estratégias de triagem HTS para identificar moléculas anti-ZIKV. A primeira estratégia foi fenotípica, utilizando ensaios celulares baseados em replicon, sistema no qual o genoma viral é modificado substituindo-se as proteínas estruturais por um gene repórter. Dessa forma, não há formação de novas partículas virais infectantes, mas o complexo de replicação é mantido totalmente funcional. Esta abordagem foi utilizada para avaliar 560 moléculas, dentre as quais, 4 foram capazes de inibir a replicação do replicon, sendo o Remdesivir a mais promissora devido ao seu alto índice de seletividade (IS = 88,6). A segunda estratégia foi baseada em alvo e consistiu em utilizar a protease recombinante de ZIKV, NS2B-NS3, expressa em bactérias e purificada em 3 etapas, para avaliar 4576 moléculas em ensaios de atividade enzimática, o que possibilitou a identificação de 7 compostos capazes de inibir a enzima em mais de 80%. Ambas as estratégias se mostraram muito eficientes para os objetivos propostos, contribuindo para o avanço na busca de potenciais agentes anti-ZIKV. Os próximos passos serão a confirmação da inibição da replicação viral pelos 4 compostos resultantes da triagem fenotípica por quantificação do RNA replicon, utilizando qRT-PCR, e também através de ensaios de infecção viral por meio de colaboração com a Prof. Ana Carolina Jardim da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Em relação os compostos identificados nos ensaios enzimáticos, estes serão validados no modelo celular expressando o replicon de ZIKV.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Esquema mostrando a poliproteína codificada pela ORF e seus produtos pós-traducionais.....	9
Figura 2. Representação esquemática da infecção viral (A) em relação à transfecção celular com sistemas replicons subgenômicos (B).	11
Figura 3: Esquema do replicon RepZIKV_IRES-Neo utilizado neste projeto.....	15
Figura 4: Comparação entre a sequência viral da protease de NS2B-NS3 de ZIKV (acima) e a sequência recombinante (abaixo)	18
Figura 5: HTS antivirais para a COVID <i>Box</i> e <i>Pathogen Box</i>.	20
Figura 6. Curvas de concentração-efeito (EC₅₀ e CC₅₀) dos compostos Remdesivir (A e B), Silmitasertib (C e D), Bedaquilina (E e F) e MMV020391 (G e H)	21
Figura 7. Purificação da protease NS2B-NS3.....	23
Figura 8. Ensaio enzimático da NS2B-NS3.....	24

Listas de tabelas

Tabela 1: Atividade antiviral contra a replicação do ZIKV e citotoxicidade dos compostos selecionados COVID Box e <i>Pathogen Box</i> . Fonte: desenvolvido pelo autor.....	22
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Descoberta do Zika vírus, surtos e consequências	8
1.2. Características do ZIKV	9
1.3. Sistemas replicons como ferramentas de triagem de agentes antivirais	10
1.4. Ensaio enzimáticos para a identificação de inibidores da protease viral	12
2. OBJETIVOS	13
1.1. Objetivo geral	13
1.1. Objetivos específicos	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Biblioteca de compostos	14
3.2. Replicon de Zika Vírus (RepZIKV IRES-Neo)	14
3.3. Ensaio HTS antivirais com a linhagem BHK-21-RepZIKV_IRES-Neo	15
3.3.1. Atividade da Rluc	15
3.3.2. Citotoxicidade	15
3.4. Determinação das curvas dose-resposta (EC50 e CC50)	15
3.5. Triagens enzimáticas utilizando a protease de ZIKV (NS2B-NS3)	16
3.5.1. Expressão e purificação da NS2B-NS3	16
3.5.2. Ensaio enzimáticos	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Triagens HTS utilizando a linhagem replicon de ZIKV	18
4.2. Expressão e purificação da protease ZIKV NS2B-NS3	20
4.3 Validação da atividade enzimática da ZIKV NS2B-NS3 purificada e triagens enzimáticas	21
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	25
7. PERSPECTIVAS	25
8. REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descoberta do Zika vírus, surtos e consequências

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus (vírus transmitido por vetor artrópode) do gênero *Flavivirus*, o qual inclui o vírus da dengue (*Dengue virus*, DENV), vírus do Nilo Ocidental (*West Nile virus*, WNV), vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus*, JEV), vírus da febre amarela (*Yellow Fever virus*, YFV), entre outros (OSTER et al., 2016). Sua transmissão horizontal ocorre através da picada de seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, o qual também transmite os vírus da dengue, Chikungunya e febre amarela (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019). Embora menos frequente, a transmissão vertical também já foi relatada, ocorrendo a passagem do vírus de mãe para filho (MLAKAR et al., 2016) e por via sexual (XIE et al., 2016a).

O ZIKV foi primeiramente identificado em 1947 em macacos rhesus na Uganda (DICK, 1952) e o primeiro caso de infecção humana foi relatado em 1954, na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Houveram poucas e isoladas infecções descritas até a ocorrência do primeiro surto em 2007 na Micronésia (Oceania), seguido de uma grande epidemia na Polinésia Francesa e Nova Caledônia (Pacífico Sul) em 2013 e 2014, respectivamente (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Em 2015, a epidemia de ZIKV atingiu as Américas, principalmente o Brasil, onde resultou em cerca de 1 milhão e 300 mil casos suspeitos da doença (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). Apesar da diminuição do número de casos reportados a partir de 2017, o vírus foi identificado em circulação em 87 países em 2019, evidenciando o seu potencial em reemergir como uma nova epidemia (PIELNAA et al., 2020).

A maioria das infecções causadas pelo ZIKV são assintomáticas ou são leves e típicas de arboviroses, resultando em febre, cefaleia e dores nas articulações (SHEHU et al., 2018). Porém, o vírus tem potencial de causar algumas graves enfermidades, anomalias oculares (MASMEJAN et al., 2020), abortos espontâneos (SHEHU et al., 2018), microcefalia e malformações neurológicas em fetos nascidos de mães infectadas (MLAKAR et al., 2016), além da síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos (CAO-LORMEAU et al., 2016). O único método de profilaxia é o controle dos mosquitos vetores (CORBEL et al., 2016), pois não há vacinas ou fármacos disponíveis (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020). Frente à ameaça de uma nova epidemia de ZIKV e dada a carência de artifícios para manejo da doença, esforços urgentes precisam ser feitos para desenvolver um tratamento eficaz e seguro (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020).

1.2. Características do ZIKV

O genoma de RNA do vírus, possui aproximadamente 11 kb de extensão e codifica para suas proteínas de forma similar aos membros de seu gênero (WANG et al., 2017). Possui uma longa fase aberta de leitura (ORF – *open-reading frame*) flanqueada por uma 5' UTR (região não traduzida - *untranslated region*) e uma 3' UTR. A ORF codifica para uma única poliproteína, a qual é clivada por proteases virais e do hospedeiro para gerar 10 proteínas individuais, sendo 3 estruturais (capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E)) e 7 não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (XIE et al., 2016a) (Figura 1).

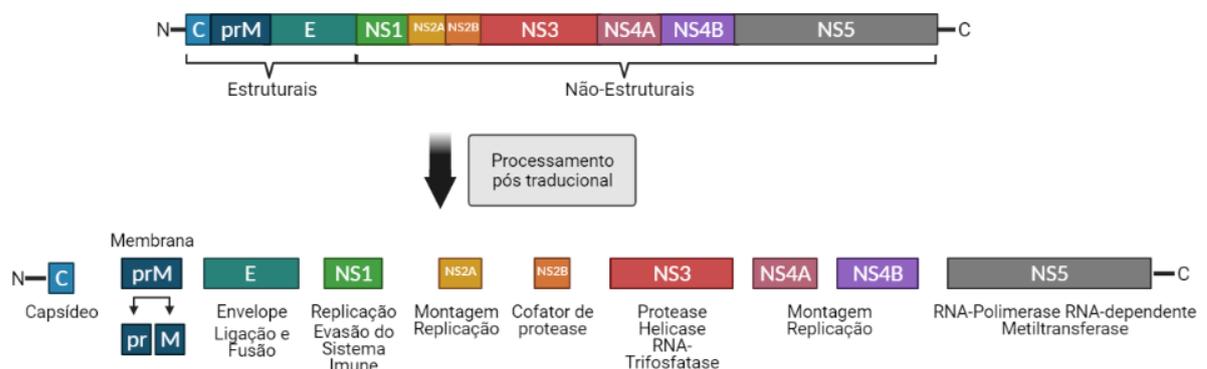


Figura 1: Esquema mostrando a poliproteína codificada pela ORF e seus produtos pós-traducionais. O processamento da poliproteína dá origem a 10 proteínas virais: três proteínas estruturais, capsídeo (C), pré-Membrana (prM) e envelope (E); e, 7 proteínas não-estruturais (NSs), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Fonte: Esquema desenvolvido pelo autor em BioRender.com.

As proteínas estruturais formam as partículas virais e são responsáveis pela entrada, fusão e montagem do vírus; já as proteínas não-estruturais (NSs), formam o complexo de replicação que possibilitará a síntese de mais RNA viral (LI et al., 2018b). As NSs são necessárias para desenvolver todo o metabolismo viral, incluindo a formação de novas partículas virais. A enzima NS3 possui dois domínios, N-terminal protease e C-terminal RNA helicase. Sua atividade proteolítica é dependente da NS2B, que age como cofator. Junto, o complexo NS2B-NS3 protease é responsável por clivar a poliproteína viral para liberação das proteínas maduras. Já sua porção helicase, age desenrolando o RNA intermediário dupla-fita para garantir a síntese de novas moléculas de RNA viral que é catalisada pela NS5, a qual também é responsável pelo capeamento do RNA e supressão das respostas de interferons do hospedeiro (WANG et al., 2017). Já a NS2A e NS4A e B são proteínas transmembranas importantes para a formação do complexo de replicação no retículo endoplasmático (RE) (CHAMBERS et al., 1990; WELSCH et al., 2009).

A montagem da estrutura viral ocorre no final do ciclo de infecção, quando o RNA viral é recrutado pela proteína NS2A para o local de estruturação dos vírions. As partículas necessárias para esta montagem se reúnem nos sítios do RE adjacentes ao complexo de replicação e lá ocorre a encapsidação do RNA viral com a proteína C, o envolvimento com as proteínas prM e E e, posteriormente, o brotamento do vírion (CORTESE et al., 2017; ZHANG et al., 2019). A ancoragem do vírus ao hospedeiro é mediada pela proteína E, que tem potencial para se ligar a estruturas presentes em diversos tipos celulares, incluindo células do sistema nervoso central/ periférico (MINER; DIAMOND, 2017), testículo, epidídimo (MA et al., 2016) e mucosa vaginal (TANG et al., 2016). A glicoproteína E de superfície desempenha um importante papel durante a entrada do vírus, servindo como ligante e fixadora (PERERA-LECOIN et al., 2013).

1.3. Sistemas replicons como ferramentas de triagem de agentes antivirais

Replicons são sistemas subgenômicos autorreplicativos nos quais 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. Além disso, o replicon pode ser mantido de forma estável nas células através da introdução de um gene resistente à droga neste sistema, como o gene da neomicina fosfotransferase (Neo) ou da puromicina acetiltransferase (Pac) (FERNANDES et al., 2020). Como o RNA replicon não possui as proteínas estruturais, o uso desses sistemas permite a análise da replicação viral sem que ocorra a fixação, entrada e montagem dos vírions, evitando qualquer tipo de contaminação aos pesquisadores, permitindo, assim, o estudo de patógenos de forma segura (XIE et al., 2016a). A diferença entre a infecção viral e a transfecção de sistemas replicons em células de mamíferos está representada na Figura 2.

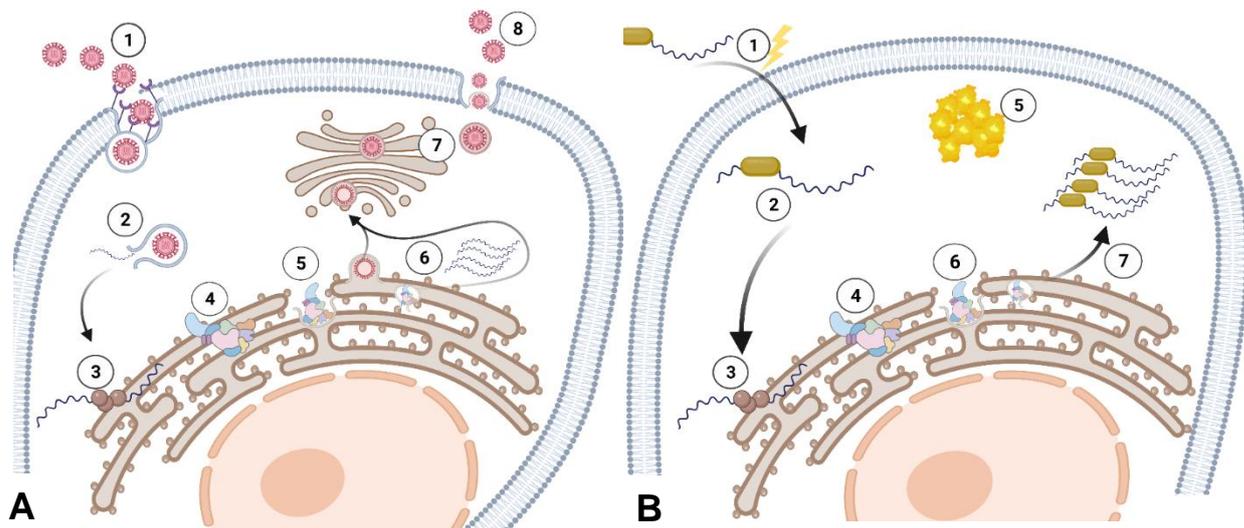


Figura 2. Representação esquemática da infecção viral (A) em relação à transfecção celular com sistemas replicons subgenômicos (B). Em A, o vírus se liga aos receptores celulares e é internalizado (1), já no citoplasma, ocorre a liberação do RNA viral (2) e sua ancoragem no retículo endoplasmático (3), dando início à tradução da poliproteína (4) que formará o complexo de replicação (5), possibilitando a síntese de mais RNA viral e formação de novas partículas virais (6) que partem para o complexo de Golgi para maturação (7) e são por fim liberadas para infectar novas células (8). Já em B, o RNA replicon é transfectado (1) para se internalizar à célula (2) e da mesma forma que o RNA viral, se ancora no retículo endoplasmático (3), onde ocorre a tradução das proteínas não-estruturais (4) e também da proteína repórter (5). As proteínas não-estruturais dão origem ao complexo de replicação (6) que, por sua vez, fará a síntese de mais RNA replicon (7). Fonte: Esquema desenvolvido pelo autor em BioRender.com.

Diversos vírus de RNA fita simples positiva, tais como DENV, WNV, YFV, vírus da Hepatite C (*Hepatitis C virus*, HCV) e SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*), atualmente possuem linhagens replicon repórteres que já foram empregadas para a descoberta de novos DAAs (*Direct-acting antivirals*) e mostraram-se muito eficazes e promissoras. Como exemplo, o HCV é hoje tratado com um combinado de fármacos descobertos pelo uso de replicons. Ademais, o uso destes sistemas também é bastante favorável por permitir ensaios antivirais para vírus que são dificilmente mantidos em cultura celular, como o rinovírus humano C (*Human Rhinovirus C*, HRV-C) (FERNANDES et al., 2020). Em relação ao ZIKV, dois sistemas replicons expressando o gene da *Renilla* luciferase (Rluc), foram estabelecidos em células humanas Huh.7 (*human hepatocarcinoma*) (XIE et al., 2016a) e em células de mamíferos, BHK-21 (*baby hamster kidney*) (LI et al., 2018a) para ensaios antivirais. Entretanto, ainda não foram divulgados na literatura resultados referentes ao uso destes sistemas para a triagem de drogas anti-ZIKV.

Em relação aos ensaios antivirais tradicionais, como a análise do efeito citopático e testes baseados em antígenos virais (XIE et al., 2016a), os quais possuem natureza de baixo rendimento, o uso de sistemas replicons permite a realização de triagem de alta performance (*high-throughput screening* - HTS), a partir de grandes bibliotecas de compostos. (FERNANDES et al., 2020; LI et al., 2018a). A linhagem replicon BHK-21-RepZIKV_IRES-

Neo utilizada neste trabalho foi estabelecida anteriormente no laboratório (FERNANDES et al., 2021b), constituída pelo replicon de ZIKV contendo o gene da proteína repórter Rluc e gene Neo de resistência transfectado em células de mamífero BHK21, tal como descrito em (XIE et al., 2016a) e já havia sido utilizada para triagem de compostos e descoberta de moléculas com ação anti-ZIKV (FERNANDES et al., 2021b). As bibliotecas de compostos utilizadas nas triagens foram gentilmente cedidas por meio de colaboração com a Fundação *Medicines for Malaria Venture* (MMV) e a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciada (*Drugs For Neglected Diseases* - DNDi).

1.4. Ensaio enzimático para a identificação de inibidores da protease viral

Além dos ensaios celulares baseados em replicon, outra importante estratégia para a avaliação de pequenas moléculas como inibidores do ZIKV são os ensaios enzimáticos, que permitem buscar os alvos específicos do complexo de replicação viral (FERNANDES et al., 2021a). Dentre as proteínas que compõe o complexo, as mais estudadas, devido aos papéis essenciais que desempenham na replicação do genoma do ZIKV, são a NS3 e a NS5 (FERNANDES et al., 2021a). O domínio N-terminal da NS3 corresponde a uma serinoprotease que corresponde ao sítio específico His51, Asp75 e Ser135, e necessita da NS2B como cofator para seu dobramento correto e catálise (LI et al., 2017; WANG et al., 2017). A atividade proteolítica da NS2B-NS3 é responsável por todas as clivagens citoplasmáticas, atuando na poliproteína viral imatura para liberação das proteínas maduras, sendo também crucial para a manutenção da infecção viral pois também atua na supressão da resposta imune do hospedeiro, clivando a proteína 16-1 relacionada à autofagia (ATG16L1), que medeia a produção de interferon tipo II (CHOUDHRY et al., 2019).

Dada à sua importância nos processos descritos acima, a protease viral se mostra um alvo interessante para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo utilizada para a triagem de grandes bibliotecas de pequenas moléculas (BALASUBRAMANIAN et al., 2016; CHOUDHRY et al., 2019; LUO; VASUDEVAN; LESCAR, 2015). Em 2016, Balasubramanian e colaboradores utilizaram as NS2B-NS3 proteases dos vírus da Dengue (DENV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV) como alvo para triagem de 120.000 compostos e conseguiram identificar 8 moléculas capazes de inibir estas enzimas. As moléculas identificadas tiveram sua ação também avaliada em replicon subgenômico, resultando na descoberta de 3 potentes inibidores da replicação viral de DENV e WNV (BALASUBRAMANIAN et al., 2016).

O plasmídeo contendo a construção da protease recombinante de ZIKV utilizado neste trabalho também havia sido estabelecido anteriormente no laboratório conforme descrito em (PHOO et al., 2016a). Para grandes bibliotecas de compostos, a estratégia de testar as moléculas primeiramente em alvos específicos do complexo de replicação viral e posteriormente em replicon subgenômico, já havia sido utilizada com sucesso (BALASUBRAMANIAN et al., 2016), dessa forma unimos as duas abordagens que já haviam sido estabelecidas no laboratório como segunda estratégia de triagem de compostos para este trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo utilizar duas estratégias para triagens HTS de bibliotecas de pequenas moléculas do MMV/DNDi (*Medicines for Malaria Ventures/Drugs for Neglected Diseases initiative*) na busca por potenciais agentes anti-ZIKV: uma, baseada em ensaios celulares com a linhagem replicon repórter de ZIKV, BHK-21-RepZIKV_IRES-Neo; e outra, através de ensaios enzimáticos com a protease NS2B-NS3.

2.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar a inibição da replicação viral pelos compostos de duas bibliotecas do MMV/DNDi através da atividade da proteína repórter (*Renilla* luciferase) do sistema replicon de ZIKV.
- II. Determinar os parâmetros de EC₅₀ (potência) e de CC₅₀ (citotoxicidade) para os compostos selecionados.
- III. Expressar e purificar a protease NS2B-NS3.
- IV. Avaliar a inibição da NS2B-NS3 pelos compostos da biblioteca QSAR do MMV/DNDi.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Biblioteca de compostos

As bibliotecas de compostos testadas nos ensaios baseados em replicon foram a *Pathogen Box* (400 moléculas) e a *COVID Box* (160 moléculas) do MMV/DNDi, as quais foram mantidas em -20 °C. Para os ensaios, os compostos ($\geq 90\%$ de pureza) a 10 mM em DMSO 100% (v/v) foram diluídos no sobrenadante celular para uma concentração de 10 μM e volume final de 1% de DMSO. Para os ensaios enzimáticos, foram testados aproximadamente 4.576 compostos da biblioteca QSAR do MMV/DNDi. Os compostos a 10 mM em 100% DMSO (v/v) foram diluídos para 1 mM 1% DMSO em tampão de reação da protease.

3.2. Replicon de Zika Vírus (RepZIKV IRES-Neo)

A construção do replicon repórter de ZIKV, sob o controle do promotor T7 para a transcrição *in vitro* do RNA, contém a região 5' UTR, as sequências codificadoras dos 38 aminoácidos da região N-terminal da proteína C e também os 30 aminoácidos da região C-terminal da proteína E, importantes para a correta replicação do RNA viral (HAHN et al., 1987; KHROMYKH et al., 2001), seguidos pelo gene *Rluc*, o gene da autoprotease 2A do *foot-and-mouth disease virus* (FMDV) e das NSs 1 a 5. Adicionalmente, possui o cassette IRES-Neo para a expressão do gene de resistência à neomicina direcionada pela sequência de reconhecimento ribossomal interna (*internal ribosome entry site*, IRES) na região 3' UTR, seguida de uma sequência de ribozima do vírus da hepatite delta (*hepatitis delta virus ribozyme* - HDVr), responsável por manter a extremidade 3' autêntica do transcrito viral, evitando erros de ancoragem e tradução (FERNANDES et al., 2021b). Um esquema do replicon de ZIKV utilizado neste projeto é mostrado na Figura 3.

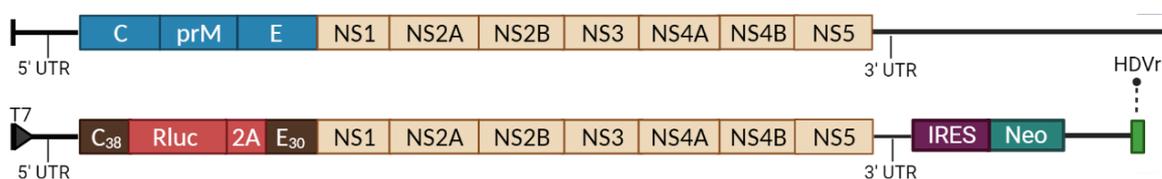


Figura 3: Esquema do replicon RepZIKV_IRES-Neo utilizado neste projeto. O genoma viral é mostrado acima da construção do replicon, evidenciando as diferenças entre as duas sequências. T7 – promotor bacteriófago T7; C₃₈ - 38 aminoácidos da porção N-terminal do capsídeo; Rluc - *Renilla* luciferase; 2^a - autoprotease 2A (FMDV); E₃₀ - 30 aminoácidos finais da região C-terminal do envelope; NSs - proteínas não estruturais; IRES-Neo - cassete de expressão que contém o gene da neomicina fosfotransferase (Neo), dirigido pela sequência de reconhecimento ribossomal interna (*internal ribosome entry site*, IRES); HDVr - ribozima do vírus da hepatite delta. Fonte: Esquema desenvolvido pelo autor em BioRender.com.

3.3. Ensaios HTS antivirais com a linhagem BHK-21-RepZIKV_IRES-Neo

3.3.1. Atividade da Rluc

As células BHK-21-RepZIKV_IRES-Neo foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e G418 a 500 µg/mL, a 37 °C sob atmosfera de 5% CO₂. Após atingirem 70-90% de confluência, estas células foram tripsinizadas e centrifugadas a 125 x g 5 min. Em seguida, foram ressuspensas em meio DMEM 10% SFB e ajustadas para 2 x 10⁴ células em 100 µL/poço de placas de 96 poços transparentes (KASVI). As placas foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 16 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado meio DMEM 2% aos poços das placas (100 µL/poço) para evitar a interação dos compostos com o soro (XIE et al., 2016a). Os compostos foram então adicionados a 10 µM de concentração e as placas foram incubadas na estufa de CO₂ a 37 °C. Após 48 h, as células foram lisadas em 15 µL de tampão de lise *Renilla* luciferase lysis buffer 1X (Promega) por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, 12 µL/poço do lisado celular foram transferidos para placas de 96 poços brancas opacas, contendo 50 µL/poço de tampão de reação (substrato + tampão de ensaio) do kit *Renilla* luciferase Assay System (Promega). Células em 1% DMSO foram utilizadas como controle negativo (0% inibição) enquanto que o composto NITD008, um potente inibidor da NS5 RdRp de flavivírus (YIN et al., 2009), a 10 µM foi usado como controle positivo (100% inibição). A leitura da luminescência foi realizada no equipamento SpectraMax i3 Multi-mode Detection Platform (Molecular Devices).

3.3.2. Citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade, foi realizado o ensaio de viabilidade celular baseado em WST-8, composto capaz de ser reduzido por desidrogenases celulares, formando um produto de cor amarela (formazan), com a quantidade de formazan formado diretamente proporcional ao número de células vivas, utilizando o Cell Counting kit-8 (CCK8 – Sigma Aldrich) (XIE et al., 2016b). Após a incubação com os compostos, foi adicionada solução CCK8 a 1/10 do volume dos poços (10 µL/poço) e as placas foram incubadas na estufa de CO₂ a 37 °C por 2 h. Em seguida a absorbância foi medida a 450 nm no SpectraMax 384 Plate Reader (Molecular Devices). Células em 1% DMSO foram utilizadas como controle negativo do ensaio.

3.4. Determinação das curvas concentração-efeito (EC₅₀ e CC₅₀)

Os compostos que inibiram a atividade da Rluc em ≥ 80% e não se mostraram tóxicos para as células replicon (viabilidade celular acima de 80%) foram avaliados de maneira

concentração-efeito. Aproximadamente 2×10^4 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/poço de DMEM 2% SFB por poço. Os compostos selecionados foram adicionados aos poços das placas em duplicata, em diluição seriada (fator 2) iniciando em 100 µM até 0,2 µM, e então as placas foram incubadas a 37 °C 5% CO₂.

Para determinar a EC₅₀, após 48 h, as células foram lisadas e 12 µL/poço de lisado celular foram transferidos para placas brancas, conforme descrito no item 3.3.1. 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 citotoxicidade descrito no item 3.3.2. As concentrações de composto capazes de inibir 50% da atividade da Rluc (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, totalizando 4 curvas de diluição seriada.

3.5. Triagens enzimáticas utilizando a protease de ZIKV (NS2B-NS3)

3.5.1. Expressão e purificação da NS2B-NS3

A protease recombinante de ZIKV, correspondendo aos resíduos 45-96 do cofator NS2B ligado aos resíduos 1-177 do domínio protease da NS3 por um espaçador (*linker*) rico em glicina [G₄SG₄], foi obtida conforme descrito previamente para o vírus da febre amarela (NOSKE et al., 2020). Sua construção pode ser observada na figura 4, em comparação com a sequência nativa da protease. Foram removidos os resíduos transmembrana da NS2B, pois são regiões hidrofóbicas que dificultam a purificação, e também a região helicase da NS3 foi completamente removida. Ligando a NS3 à NS2B foi adicionado uma região rica em glicina [G₄SG₄] como *linker*. Para possibilitar a purificação por afinidade, foi adicionada a sequência de 6 histidinas, junto à sequência da proteína SUMO, para conferir maior solubilidade. Entre os resíduos da NS2B e a sequência da SUMO, foi adicionado uma sequência de clivagem da protease TEV, para viabilizar a separação entre a HIS-SUMO-TAG e a NS2B-NS3 recombinante.

presença de 3 mg de TEV protease e 4 mM de DTT. As frações foram então separadas por uma nova passagem pela coluna HisTrap, acoplada a um GE ÄKTA pure, desta vez a proteína foi obtida na fração que atravessou diretamente a coluna, a protease TEV ficou retida na coluna pois possuía his-TAG. A última etapa de purificação foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (gel filtração) para separação por tamanho. Para isto, foi utilizada uma coluna HiLoad Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) equilibrada com tampão C (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 5% glicerol, pH 7,5) e acoplada a um GE ÄKTA pure,

A pureza final das amostras foi analisada por SDS-PAGE 15% e estas foram quantificadas utilizando a absorção em 280 nm, medidas em Nanodrop 1000 (ThermoFischer Scientific) e calculadas pelo coeficiente de absorção teórico de $43,555 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Alíquotas a 2,3 mg/mL foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para a realização dos ensaios de atividade.

3.5.2. Ensaio enzimáticos

A enzima purificada foi utilizada para as triagens realizadas em placas de 384 poços de aproximadamente 4.576 compostos da biblioteca QSAR do MM/DNDi. O ensaio consistiu em medir a fluorescência no SpectraMax (Molecular Devices), obtida pela reação entre a NS2B-NS3 e o substrato BZ-NKRR-AMC, que resulta na liberação de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) (FERNANDES et al., 2021a; PHOO et al., 2016b). Primeiramente, para validar a atividade da enzima, utilizamos a Aprotinina, um conhecido inibidor específico de protease de flavivírus (FERNANDES et al., 2021a). A reação foi realizada em placas Corning® de 384 poços brancas ou pretas, utilizando tampão de reação contendo 20 mM Tris pH 8,5, 10% glicerol e 0,01% Triton X-100. A NS2B-NS3 foi adicionada a uma concentração final de 5 nM aos poços contendo o tampão de reação e, em seguida, a aprotinina foi adicionada à reação na concentração de 10 μM . Após 15 min de incubação à $37 \text{ }^\circ\text{C}$, o substrato foi adicionado, em uma concentração final de 30 μM . A reação foi mantida a temperatura constante de 37°C , com a fluorescência monitorada a cada 1 min e 30 s durante 15 min. Os comprimentos de onda utilizados para excitação e emissão foram respectivamente 380 nm e 460 nm.

A reação montada nas placas Corning® de 384 poços brancas ou pretas continha a protease na concentração final de 5 nM em tampão de reação, esta foi utilizada para testagem dos compostos da biblioteca QSAR, na concentração de 10 μM , para controle negativo, foi utilizado 1% DMSO e para controle positivo a aprotinina na concentração de 10 μM . O substrato foi adicionado numa concentração final de 30 μM .

4. RESULTADOS

4.1. Triagens HTS utilizando a linhagem replicon de ZIKV

Os compostos do MMV COVID *Box* e *Pathogen Box* foram triados inicialmente à 10 μ M 1% DMSO em placas de 96 poços, usando a linhagem celular BHK21- RepZIKV_IRES-Neo. Os dados foram relatados como um log da porcentagem de inibição em relação aos controles 1% DMSO (negativo, 0% de inibição) e NITD008 (positivo, 100% de inibição) (Figura 5).

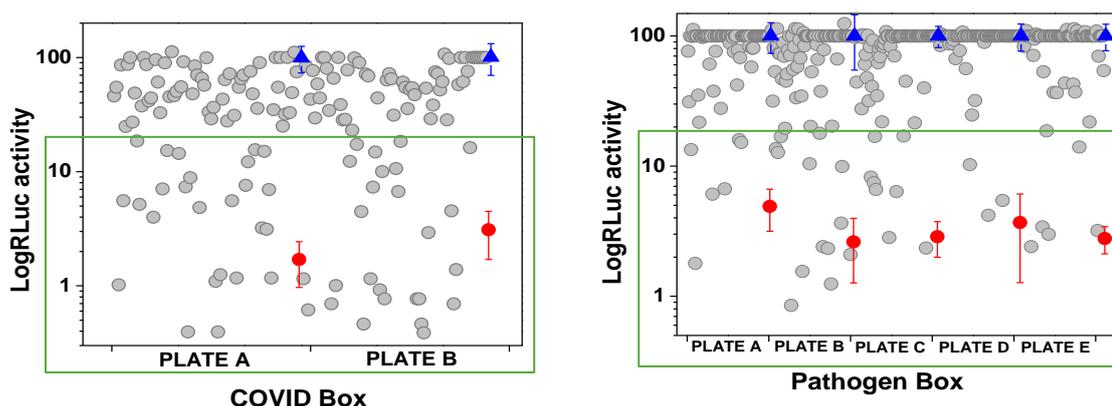


Figura 5: HTS antivirais para a COVID *Box* e *Pathogen Box*. Gráfico de dispersão para resultados de triagem dos 160 compostos das 2 placas de 96 poços (Placa A e B) da COVID *Box* e 400 compostos das 5 placas de 96 poços (Placa A a E) da *Pathogen Box*: No eixo y, a atividade RLuc relativa para os compostos testados à 10 μ M (cinza claro), controle negativo 1% DMSO (azul) e controle positivo NITD008 à 10 μ M (vermelho). Dentro do quadrado verde estão os compostos que inibiram > 80% o sinal da RLuc. Os valores relativos de RLuc são mostrados em escala logarítmica para clareza. Fonte: desenvolvido 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. Dos 560 compostos avaliados (COVID *Box* + *Pathogen box*), 88 diminuíram os sinais da luciferase em $\geq 80\%$ (Figura 5) e 11 destes, exibiram baixa toxicidade (dados não mostrados). Em seguida, para estas 11 moléculas selecionadas ($\geq 80\%$ de viabilidade celular) foram realizadas curvas concentração-efeito e os valores de EC_{50} e CC_{50} foram determinados para 4 moléculas: o antiviral Remdesivir e o antitumoral Silmitasertib da COVID *Box*; e, o antimicrobacteriano Bedaquilina e o antimalárico MMV020391 da *Pathogen Box* (Figura 6).

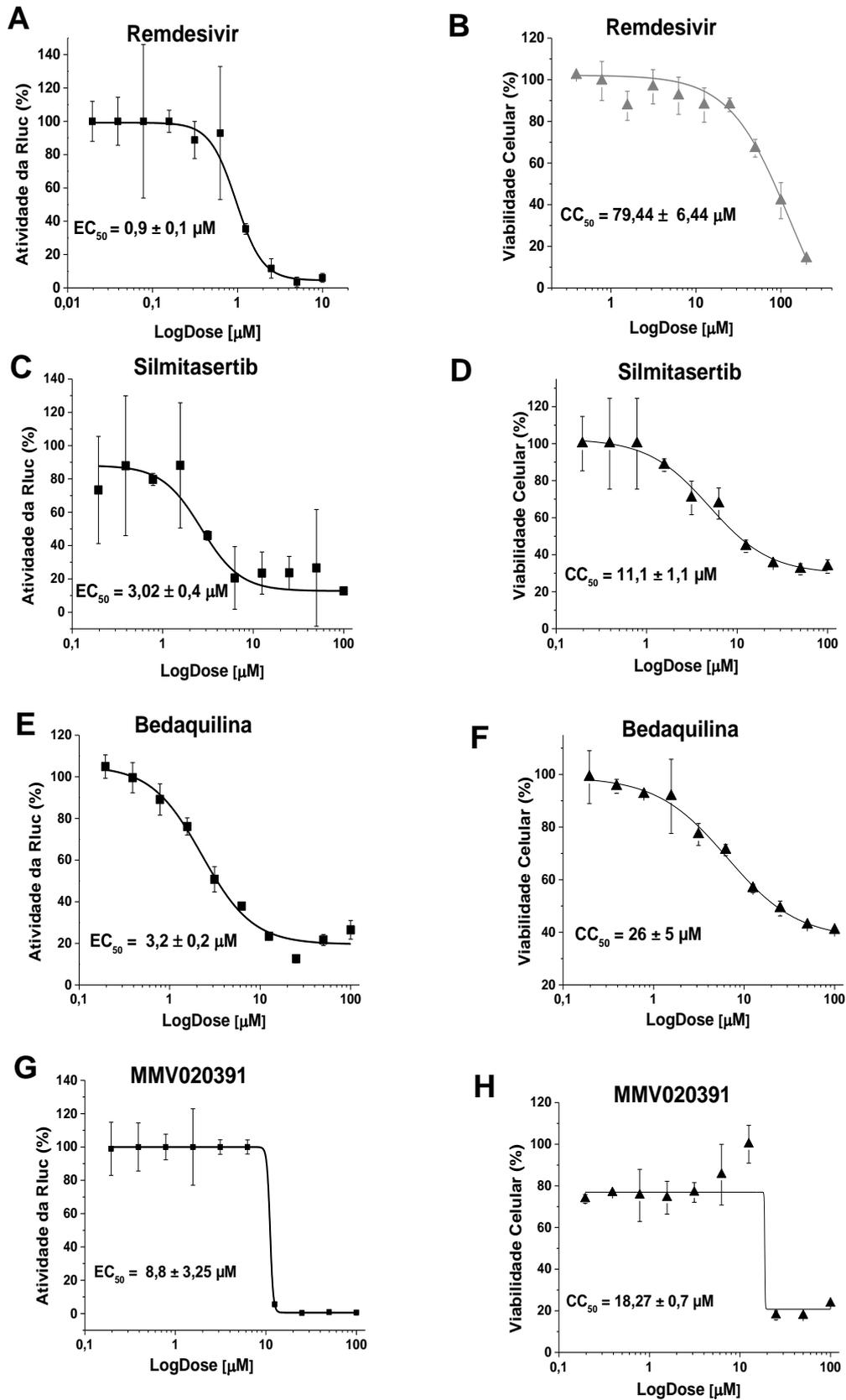
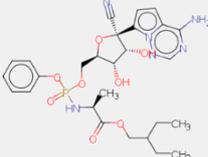
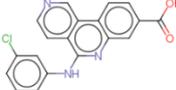
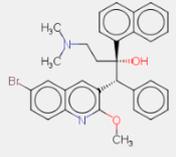
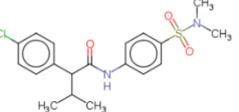


Figura 6. Curvas de concentração-efeito (EC_{50} e CC_{50}) dos compostos Remdesivir (A e B), Silmitasertib (C e D), Bedaquilina (E e F) e MMV020391 (G e H). As células BHK-21-RepZIKV_IRES-Neo foram incubadas com os compostos em diluições seriadas por 48 h e a atividade Rluc foi medida a partir de lisados celulares. Os gráficos são representativos de dois ensaios independentes realizados em duplicata. Barras de erro representam desvios-padrão. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Os quatro compostos exibiram atividades efetivas na faixa de nano a baixo micromolar. Além disso, o Remdesivir apresentou baixa toxicidade para as células replicon enquanto o Silmitaserib, a Bedaquilina e o composto MMV020391 exibiram moderada toxicidade, resultando em valores de índice de seletividade ($SI = CC_{50} / EC_{50}$) de, respectivamente, 88,6, 3,7, 8,1 e 2,1 (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade antiviral contra a replicação do ZIKV e citotoxicidade dos compostos selecionados COVID Box e *Pathogen Box*. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Composto	Estrutura	Classificação	Nome	C_{50}	CC_{50}	IS
MMV1803859		Antiviral	Remdesivir	$0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$	$79,4 \pm 6,4 \mu\text{M}$	88,6
MMV083882		Antitumoral	Silmitasertib	$3,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$	$11,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$	3,7
MMV689758		Antimicobacteriano	Bedaquiline	$3,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$	$26 \pm 5 \mu\text{M}$	8,1
MMV020391		Antimalárico	-	$8,8 \mu\text{M}$	$18,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$	2,1

4.2. Expressão e purificação da protease ZIKV NS2B-NS3

Após a transformação bacteriana, a purificação da enzima NS2B-NS3 foi realizada em três etapas e os resultados foram analisados por SDS-PAGE (Figuras 7 A e B).

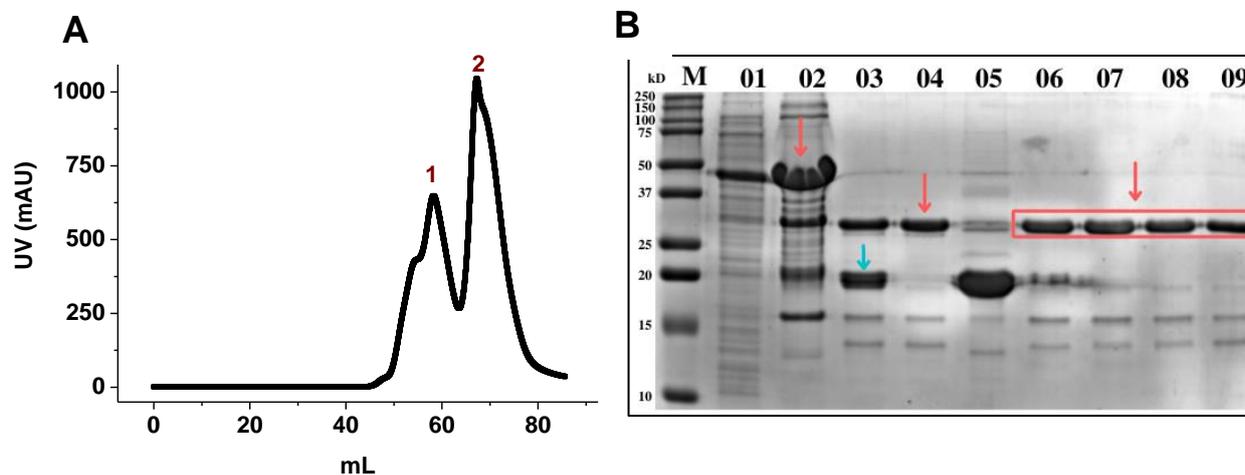


Figura 7. Purificação da protease NS2B-NS3. Em (A) é mostrada a etapa de cromatografia de exclusão molecular. o volume coletado que passou pela coluna HiLoad Superdex 75 16/60 (eixo X), demonstra 2 picos de absorvância (eixo Y), correspondentes à eluição da NS2B-NS3. Em (B), o SDS-PAGE realizado com as amostras dos processos. A coluna n° 1 é o marcador de peso molecular, e a partir da coluna n°2, tem-se as amostras coletadas durante o processo de purificação. A amostra 01 corresponde ao lisado solúvel, a 02 é correspondente a fração eluída da primeira cromatografia de afinidade, a 03 corresponde à diálise, a 04 corresponde ao que passou direto pela segunda cromatografia de afinidade, a 05 é a eluição da segunda afinidade, as amostras 06-09 são da cromatografia de exclusão molecular, sendo que a 06 corresponde ao primeiro pico e as 07-09 correspondem ao 2° pico. Fonte: desenvolvido pelo autor.

Observa-se na Figura 7B que a proteína estava presente no lisado solúvel representado na amostra 01, assim como na amostra 02 (fração eluída da coluna de afinidade HisTrap), demonstrando que a proteína ainda estava ligada à 6xHIS-tag e à SUMO. A amostra 03 representa a etapa de clivagem mostrando a separação da SUMO com a 6xHIS-tag (seta azul). A amostra 04 representa o que passou pela segunda passagem na coluna de HisTrap, mostrando a proteína praticamente pura; a amostra 05 é a eluição desta segunda passagem, mostrando a SUMO com a 6xHIS-tag. As amostras 06-09 mostram a proteína coletada na gel filtração (seta vermelha), sendo a amostra 06 do primeiro pico, referente as frações 55-57 mL, não utilizada para as triagens, e 07-09 do segundo pico, referente as frações entre 65-75 mL, utilizadas para as triagens, com tamanho de aproximadamente 29 kD, o que está bem próximo do esperado de 24,6 kD. Obteve-se alto rendimento ao final, de aproximadamente 9 mg/L de cultura bacteriana.

4.3. Validação da atividade enzimática da ZIKV NS2B-NS3 purificada e triagem enzimática

A proteína purificada foi avaliada quanto à sua atividade enzimática através do monitoramento da fluorescência resultante da liberação de AMC do substrato, o BZ-NKRR-AMC, que ocorre pela atividade proteolítica da enzima (FERNANDES et al., 2021a). Como controle positivo do ensaio foi utilizada a Aprotinina (10 μ M), e como pode-se observar na Figura 8A, a protease é capaz de clivar o substrato satisfatoriamente, atingindo níveis de

fluorescência de 20.000 mAU e o inibidor foi altamente eficaz em inibir a atividade proteolítica da enzima, mantendo os níveis de leitura próximos de 0.

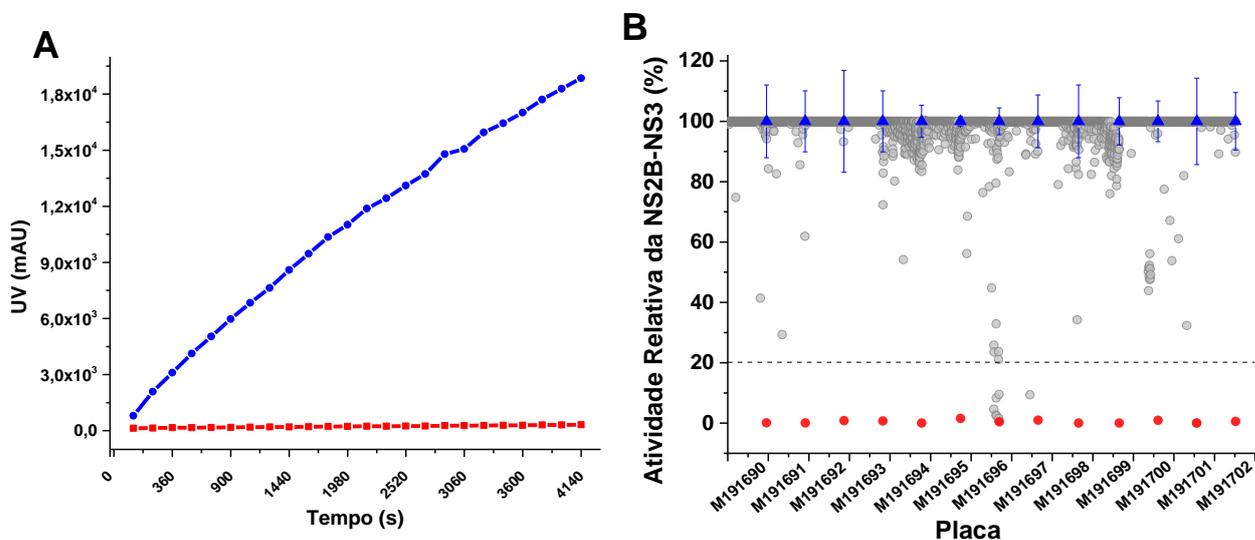


Figura 8. Ensaio enzimático da NS2B-NS3. (A) Atividade da protease de ZIKV utilizando BZ-NKRR-AMC como substrato e aprotinina como inibidor. A fluorescência (eixo Y), foi medida a cada 1 min e 30 s (eixo X). A linha azul representa a leitura do substrato e a linha vermelha a leitura da aprotinina. (B) HTS da biblioteca QSAR. Gráfico de dispersão para resultados de triagem de 4.576 compostos de 13 placas de 384 poços (Placas M191690 – M191702) (eixo x). No eixo y, a atividade da enzima em porcentagem para os compostos testados à 10 µM (cinza claro). A proteína incubada com o substrato e 1% DMSO é utilizada como controle negativo, representando 100% de atividade (azul), e para controle positivo é utilizado aprotinina à 10 µM (vermelho). Fonte: desenvolvido pelo autor.

Os compostos da biblioteca QSAR, foram triados a 10 µM 1% DMSO em placas de 384 poços. A porcentagem de inibição foi calculada por meio da inclinação da reta resultante dos pontos de cada leitura no intervalo de tempo de 15 min. A média das inclinações das retas da Aprotinina foi usada como 0% e a média das inclinações das retas dos poços com enzima, substrato e 1% DMSO foram usadas como 100%. Dos 4.576 compostos avaliados, 7 apresentaram inibição de mais de 80% (Figura 8B).

5. DISCUSSÃO

O Zika vírus continua causando ocasionais infecções ao redor do mundo e a possibilidade de uma nova epidemia é sempre latente, principalmente no Brasil e países tropicais por conta da alta população do seu mosquito vetor (PIELNAA et al., 2020). Este fato se torna ainda mais alarmante somado a ausência de qualquer forma de terapia ou prevenção da doença. Neste trabalho, utilizamos duas estratégias para triagens em larga escala de bibliotecas de pequenas moléculas do MMV/DNDi na busca por agentes anti-ZIKV. A primeira delas, consistiu na utilização da linhagem replicon repórter BHK-21-RepZIKV_IRES_Neo (FERNANDES et al., 2021b) para triagem de aproximadamente 600 moléculas das bibliotecas *COVID Box* e *Pathogen Box*, ambas compostas por moléculas diversas, disponíveis comercialmente ou em desenvolvimento. Os ensaios celulares baseados no replicon de ZIKV se mostraram bastante eficazes para a identificação de possíveis inibidores da replicação viral, resultando na descoberta de 4 compostos capazes de inibir o sinal da Rluc em > 80%; o Silmitasertib, a Bedaquilina, o composto MMV020391 e o Remdesivir, com índices de seletividade variando de 2,1 a 88,6.

O Silmitasertib é uma promissora molécula anti-tumoral, capaz de inibir a proteína quinase ser/Thr CK2, uma enzima chave no estudo do câncer relacionada diversas vias do metabolismo basal das células, como crescimento, proliferação, captação de glicose, entre outras. A molécula está em fase pré-clínica e apresenta resultados promissores, sendo utilizada atualmente para tratar pacientes com carcinoma celular basal, colangiocarcinoma, câncer renal e pacientes pediátricos afetados com meduloblastoma (D'AMORE et al., 2020). Já a Bedaquilina é uma diariquinolina aprovada pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration – FDA*) como fármaco para tuberculose, sendo um inibidor específico da ATP sintase micobacteriana e com 20.000 vezes menos afinidade pela ATP sintase humana, o que indica baixo risco de toxicidade (KHOSHNOOD et al., 2021). Apesar de não haver nenhum estudo sobre o efeito antiviral dessas moléculas na literatura, a utilização de ambas, Silmitasertib e Bedaquilina, como possíveis fármacos anti-ZIKV seria muito interessante visto que já são substâncias aprovadas e possuem administração via oral. Apesar de demonstrarem moderada toxicidade nos ensaios com o replicon viral, o que resultou em ISs abaixo de 10, a atividade destas moléculas frente à infecção viral ainda precisa ser determinada, assim como seus mecanismos de ação contra o ZIKV.

O composto MMV020391 possui menos dados depositados na literatura, mas sabe-se que apresenta atividade antimalárica, agindo no parasita *Plasmodium falciparum* em estágio

assexuado no sangue, com valores de IC_{50} de 0,64 a 0,93 e CC_{20} de 5,35 contra células HepG2 (PUBCHEM), resultando em IS de 6,81, que tal qual o obtido para ZIKV (IS de 2,1), evidencia que a toxicidade desta molécula pode ser um problema para seu desenvolvimento como potencial fármaco.

Por sua vez, o Remdesivir (RDV), é um pró-fármaco análogo de nucleosídeo identificado neste trabalho como potente inibidor da replicação do ZIKV (IS de 88,6). Este composto é um conhecido antiviral de amplo espectro, que apresenta atividade contra vírus de RNA de diversas famílias, como Coronaviridae, Filoviridae e Flaviviridae. Seu modo de ação consiste na inibição da NS5 RNA polimerase RNA dependente, inviabilizando a síntese de mais RNA viral. O Remdesivir é um fármaco aprovado para tratamento da Ebola e também teve seu uso emergencial aprovado para tratamento da COVID-19 (SANTORO; CARAFOLI, 2021), porém apresenta baixa disponibilidade via oral, precisando ser administrado de forma intravenosa (LAMB, 2020). Apesar disso, nossos dados demonstram que o composto é bastante promissor para ser melhor caracterizado como potencial agente anti-ZIKV.

A segunda estratégia abordada neste trabalho foi a utilização da enzima NS2B-NS3 para a avaliação da biblioteca QSAR do MMV/DNDi. Foi possível obter com sucesso a proteína pura com alto rendimento para realizar os ensaios e validar sua atividade utilizando a Aprotinina. Em seguida, foram triados 4.576 compostos, resultando em 7 moléculas capazes de inibir a ação da protease em $\geq 80\%$. Estes compostos serão futuramente avaliados nos ensaios baseados no replicon para validar sua atividade em modelo celular. Dessa forma, buscamos identificar inibidores da protease de ZIKV que sejam capazes de atravessar membrana celular, agindo diretamente no complexo de replicação viral e que ao mesmo tempo não sejam tóxicos para as células.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem significativamente com a busca por fármacos anti-ZIKV, visto que a utilização das duas estratégias abordadas permitiu a identificação de 4 compostos potenciais inibidores do complexo de replicação e 7 com atividade contra a protease viral. O Remdesivir se mostrou uma molécula bastante promissora, com um grande potencial para ser melhor caracterizado frente à infecção viral e por ventura se tornar um fármaco de uso emergencial tal qual é feito para COVID-19.

7. PERSPECTIVAS

Os próximos passos deste trabalho em relação aos ensaios baseados em replicon, serão confirmar a inibição da replicação viral pelo Silmitasertib, Bedaquilina, MMV020391 e Remdesivir por meio da quantificação do RNA replicon das células tratadas com estas moléculas em suas concentrações efetivas por ensaios de RT-qPCR e, por meio de colaboração estabelecida com o grupo da Prof. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), avaliar a atividade destes compostos frente à infecção viral. Já, em relação às triagens com a NS2B-NS3, iremos validar a atividade dos 7 compostos do MMV/DNDi identificados nos ensaios baseados no replicon viral e assim verificar a atividade no modelo celular.

8. REFERÊNCIAS

BALASUBRAMANIAN, Anuradha; MANZANO, Mark; TERAMOTO, Tadahisa; PILANKATTA, Rajendra; PADMANABHAN, Radhakrishnan. High-throughput screening for the identification of small-molecule inhibitors of the flaviviral protease. **Antiviral research**, [S. l.], v. 134, p. 6–16, 2016. DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.08.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27539384/>. Acesso em: 18 jan. 2022.

CAO-LORMEAU, Van Mai et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, [S. l.], v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26948433/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

CHAMBERS, Thomas J.; HAHN, Chang S.; GALLER, Ricardo; RICE, Charles M. **Flavivirus genome organization, expression, and replication** Annual Review of Microbiology Annual Reviews Inc., , 1990. DOI: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2174669/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

CHOUDHRY, Hani et al. Zika Virus Targeting by Screening Inhibitors against NS2B/NS3 Protease. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/3947245. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36893251/>. Acesso em: 23 mar. 2022.

CORBEL, Vincent et al. Tracking Insecticide Resistance in Mosquito Vectors of Arboviruses: The Worldwide Insecticide resistance Network (WIN). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 10, n. 12, 2016. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0005054.

CORTESE, Mirko et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. **Cell Reports**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 2113–2123, 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28249158/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

D'AMORE, Claudio; BORGIO, Christian; SARNO, Stefania; SALVI, Mauro. Role of CK2 inhibitor CX-4945 in anti-cancer combination therapy - potential clinical relevance. **Cellular oncology (Dordrecht)**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 1003–1016, 2020. DOI: 10.1007/S13402-020-00566-W. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33052585/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

DICK, G. W. A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952. DOI: 10.1016/0035-9203(52)90042-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12995440/>. 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 MDPI AG, , 2020. DOI: 10.3390/v12060598. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32486283/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

FERNANDES, Rafaela S.; NOSKE, Gabriela D.; GAWRILJUK, Victor O.; OLIVEIRA, Ketyllyn I. Z. De; GODOY, Andre S.; MESQUITA, Nathalya C. M. R.; OLIVA, Glaucius. High-throughput Antiviral Assays to Screen for Inhibitors of Zika Virus Replication. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, [S. l.], n. 176, p. e62422, 2021. a. DOI: 10.3791/62422.

FERNANDES, Rafaela Sachetto; DE GODOY, Andre Schutzer; DOS SANTOS, Igor Andrade; NOSKE, Gabriela Dias; DE OLIVEIRA, Ketyllyn Irene Zagato; GAWRILJUK, Victor Oliveira; GOMES JARDIM, Ana Carolina; OLIVA, Glaucius. Discovery of an imidazonaphthyridine and a riminophenazine as potent anti-Zika virus agents through a replicon-based high-throughput screening. **Virus Research**, [S. l.], v. 299, p. 198388, 2021. b. DOI: 10.1016/j.virusres.2021.198388.

HAHN, Chang S.; HAHN, Young S.; RICE, Charles M.; LEE, Eva; DALGARNO, Lynn; STRAUSS, Ellen G.; STRAUSS, James H. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 198, n. 1, p. 33–41, 1987. DOI: 10.1016/0022-2836(87)90455-4.

HENNESSEY, Morgan; FISCHER, Marc; STAPLES, J. Erin. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 55–58, 2016. DOI: 10.15585/mmwr.mm6503e1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26820163/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

KHOSHNOOD, Saeed; GOUDARZI, Mehdi; TAKI, Elahe; DARBANDI, Atieh; KOUHSARI, Ebrahim; HEIDARY, Mohsen; MOTAHAR, Moloudsadat; MORADI, Melika; BAZYAR, Hadi. Bedaquiline: Current status and future perspectives. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S. l.], v. 25, p. 48–59, 2021. DOI: 10.1016/J.JGAR.2021.02.017.

KHROMYKH, Alexander A.; MEKA, Hedije; GUYATT, Kimberley J.; WESTAWAY, Edwin G. Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 75, n. 14, p. 6719–6728, 2001. DOI: 10.1128/jvi.75.14.6719-6728.2001. Disponível em: <http://jvi.asm.org/>. Acesso em: 12 fev. 2021.

LAMB, Yvette N. Remdesivir: First Approval. **Drugs**, [S. l.], v. 80, n. 13, p. 1355, 2020. DOI: 10.1007/S40265-020-01378-W. Disponível em: </pmc/articles/PMC7459246/>. Acesso em: 24 mar. 2022.

LI, J. Q.; DENG, C. L.; GU, D.; LI, X.; SHI, L.; HE, J.; ZHANG, Q. Y.; ZHANG, B.; YE, H. Q. Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for screening inhibitors of Zika virus. **Antiviral Res**, Key Laboratory of Special Pathogens and Biosafety, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071, China University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China. Key Laboratory of Special Pathogens and Biosafety, Wuhan Insti, v. 150, p. 148–154, 2018. a. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.12.017.

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, p. 148–154, 2018. b. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.12.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29288699/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

LI, Yan; PHOO, Wint Wint; LOH, Ying Ru; ZHANG, Zhenzhen; NG, Elizabeth Yihui; WANG, Weiling; KELLER, Thomas H.; LUO, Dahai; KANG, Cong Bao. Structural characterization of the linked NS2B-NS3 protease of Zika virus. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 591, n. 15, p. 2338–2347, 2017. DOI: 10.1002/1873-3468.12741. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1873-3468.12741>. Acesso em: 23 mar. 2022.

LUO, Dahai; VASUDEVAN, Subhash G.; LESCAR, Julien. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 118, p. 148–158, 2015. DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2015.03.014.

MA, Wenqiang et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. **Cell**, [S. l.], v. 167, n. 6, p. 1511- 1524.e10, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27884405/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954. DOI: 10.1016/0035-

9203(54)90006-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13157159/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

MASMEJAN, Sophie; MUSSO, Didier; VOUGA, Manon; POMAR, Leo; DASHRAATH, Pradip; STOJANOV, Milos; PANCHAUD, Alice; BAUD, David. **Zika virus Pathogens** MDPI AG, , 2020. DOI: 10.3390/pathogens9110898. Disponível em: www.mdpi.com/journal/pathogens. Acesso em: 11 fev. 2021.

MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. **Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism Cell Host and Microbe** Cell Press, , 2017. DOI: 10.1016/j.chom.2017.01.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28182948/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

MLAKAR, Jernej et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016. DOI: 10.1056/nejmoa1600651. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26862926/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect**, Institut Louis Malarde, Papeete, Tahiti, Polynesie francaise. *dmusso@ilm.pf.*, v. 20, n. 10, p. O595-6, 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12707.

NOSKE, Gabriela Dias; GAWRILJUK, Victor Oliveira; FERNANDES, Rafaela Sachetto; FURTADO, Nathalia Dias; BONALDO, Myrna Cristina; OLIVA, Glaucius; GODOY, Andre Schutzer. Structural characterization and polymorphism analysis of the NS2B-NS3 protease from the 2017 Brazilian circulating strain of Yellow Fever virus. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1864, n. 4, p. 129521, 2020. DOI: 10.1016/j.bbagen.2020.129521.

OSTER, Alexandra M.; RUSSELL, Kate; STRYKER, Jo Ellen; FRIEDMAN, Allison; KACHUR, Rachel E.; PETERSEN, Emily E.; JAMIESON, Denise J.; COHN, Amanda C.; BROOKS, John T. Update: Interim Guidance for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus — United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [S. l.], v. 65, n. 12, p. 323–325, 2016. DOI: 10.15585/mmwr.mm6512e3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27032078/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

PATTNAIK, Aryamav; SAHOO, Bikash R.; PATTNAIK, Asit K. **Current status of zika virus vaccines: Successes and challenges** Vaccines MDPI AG, , 2020. DOI: 10.3390/vaccines8020266. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32486368/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

PERERA-LECOIN, Manuel; MEERTENS, Laurent; CARNEC, Xavier; AMARA, Ali. **Flavivirus entry receptors: An update** Viruses Viruses, , 2013. DOI: 10.3390/v6010069. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24381034/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

PHOO, Wint Wint et al. Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. **Nature Communications 2016 7:1**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2016. a. DOI: 10.1038/ncomms13410. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms13410>. Acesso em: 14 fev. 2022.

PHOO, Wint Wint et al. Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. **Nature Communications**, [S. l.], v. 7, 2016. b. DOI: 10.1038/NCOMMS13410. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28182948/>. Acesso em: 15 fev. 2022.

PIELNAA, Paul; AL-SAADAWA, Moyed; SARO, Adonira; DAMA, Marcellin Faniriantsoahenrio; ZHOU, Mei; HUANG, Yanxia; HUANG, Jufang; XIA, Zanzian. **Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development** Virology Academic Press Inc., , 2020. DOI: 10.1016/j.virol.2020.01.015.

SANTORO, M. Gabriella; CARAFOLI, Ernesto. Remdesivir: From Ebola to COVID-19. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 538, p. 145, 2021. DOI: 10.1016/J.BBRC.2020.11.043. Disponível em: /pmc/articles/PMC7836944/. Acesso em: 21 mar. 2022.

SHEHU, Nathan Yakubu; SHWE, David; ONYEDIBE, Kenneth I.; PAM, Victor C.; ABOK, Ibrahim; ISA, Samson E.; EGAH, Daniel Z. **Pathogenesis, diagnostic challenges and treatment of zika virus disease in resource-limited settings**The Nigerian postgraduate medical journalNLM (Medline), , 2018. DOI: 10.4103/npmj.npmj_36_18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30027916/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

SOUZA-NETO, Jayme A.; POWELL, Jeffrey R.; BONIZZONI, Mariangela. **Aedes aegypti vector competence studies: A review**Infection, Genetics and EvolutionElsevier B.V., , 2019. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.11.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30465912/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

TANG, William Weihao; YOUNG, Matthew Perry; MAMIDI, Anila; REGLA-NAVA, Jose Angel; KIM, Kenneth; SHRESTA, Sujan. A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. **Cell Reports**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 3091–3098, 2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.11.070. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28009279/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

WANG, Anyou; THURMOND, Stephanie; ISLAS, Leonel; HUI, Kingyung; HAI, Rong. **Zika virus genome biology and molecular pathogenesis**Emerging Microbes and InfectionsNature Publishing Group, , 2017. DOI: 10.1038/emi.2016.141. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28325921/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

WELSCH, Sonja et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. **Cell Host and Microbe**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 365–375, 2009. DOI: 10.1016/j.chom.2009.03.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19380115/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

XIE, Xuping; ZOU, Jing; SHAN, Chao; YANG, Yujiao; KUM, Dieudonné Buh; DALLMEIER, Kai; NEYTS, Johan; SHI, Pei Yong. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, [S. l.], v. 12, p. 156–160, 2016. a. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.09.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27658737/>. Acesso em: 11 fev. 2021.

XIE, Xuping; ZOU, Jing; SHAN, Chao; YANG, Yujiao; KUM, Dieudonné Buh; DALLMEIER, Kai; NEYTS, Johan; SHI, Pei Yong. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, [S. l.], v. 12, p. 156–160, 2016. b. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.09.013. Disponível em: /pmc/articles/PMC5078599/. Acesso em: 11 fev. 2021.

YIN, Z. et al. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 48, p. 20435–20439, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0907010106.

ZHANG, Xianwen; XIE, Xuping; XIA, Hongjie; ZOU, Jing; HUANG, Linfen; POPOV, Vsevolod L.; CHEN, Xinwen; SHI, Pei Yong. Zika virus NS2A-mediated virion assembly. **mBio**, [S. l.], v. 10, n. 5, 2019. DOI: 10.1128/mBio.02375-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31662457/>. Acesso em: 11 fev. 2021.