



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

RHUBIA SILVEIRA MARTINS

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS *IN VITRO* PARA PROSPECÇÃO
E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE
CITOPROTETORA OU INIBITÓRIA DO VÍRUS ZIKA**

CAMPINAS

2018

RHUBIA SILVEIRA MARTINS

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS *IN VITRO* PARA PROSPECÇÃO
E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE
CITOPROTETORA OU INIBITÓRIA DO VÍRUS ZIKA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Ciências, na área de Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA RHUBIA SILVEIRA MARTINS E
ORIENTADA PELO MARCIO CHAIM
BAJGELMAN.

Orientador: MARCIO CHAIM BAJGELMAN

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M366d Martins, Rhubia Silveira, 1992-
Desenvolvimento de ensaios *in vitro* para prospecção e avaliação de compostos com atividade citoprotetora ou inibitória do vírus da Zika / Rhubia Silveira Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Marcio Chaim Bajgelman.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Zika vírus. 2. Bioensaios. I. Bajgelman, Marcio Chaim. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of *in vitro* assays for prospection and evaluation of compounds with cytoprotection or inhibitory activity of Zika virus

Palavras-chave em inglês:

Zika virus

Biological assay

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Marcio Chaim Bajgelman [Orientador]

Rafael Elias Marques

José Luiz Proença Módena

Data de defesa: 19-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 19 de Fevereiro, 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. MARCIO CHAIM BAJGELMAN

Prof. Dr. RAFAEL ELIAS MARQUES

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PROENÇA MÓDENA

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho à Deus, à minha família e ao Léo.

"Esta elegantíssima coordenação do sol, das estrelas, dos planetas e dos cometas não podem ter outra origem que o plano e o império do Ser dotado de inteligência e poder, que tudo domina, não como alma do mundo, mas como o Senhor de todas as coisas, eterno, infinito, onipotente, onisciente. Na ausência de qualquer outra prova, um único polegar me convenceria da existência de Deus."

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À UNICAMP-BTPB pela oportunidade acadêmica no programa de pós-graduação e pela bolsa Capes fornecida pelo programa.

Ao meu Orientador Dr. Marcio Chaim Bajgelman, pela paciência, dedicação, conhecimentos transmitidos e a confiança depositada na realização deste trabalho.

À fundação CAPES pela bolsa de mestrado fornecida.

Ao LNBio – CNPEM pela infraestrutura laboratorial disponibilizada para realização de toda parte experimental desse projeto.

À toda equipe do Laboratório de Vetores Virais pela amizade, trocas de conhecimento e auxílios disponibilizados durante todo desenvolvimento da pesquisa, em especial às técnicas Jessica Toscaro, Maria Eugenia Camargo e Soledad Palameta pelas contribuições técnicas e científicas prestadas durante as fases experimentais, e pela pós-doutoranda Luciana Pereira Ruas, pelo auxílio e aprimoramento técnico e científicos na etapa de escrita do presente trabalho.

Ao CNPQ projeto 440379/2016-4 de Kleber Gomes Franchini, pelo apoio em reagentes.

Ao Dr. Rafael Elias Marques por ceder todas as cepas de flavivírus utilizadas neste projeto, linhagens celulares, bem como reagentes, discussões científicas e ensinamentos para expansão e titulação de flavivírus.

Ao Dr. Eduardo Pagani por discussões científicas e à Dra. Silvana Rocco por disponibilizar o fármaco Prochlorperazina.

Ao laboratório de Vetores Virais pela preparação de lentivírus, vírus FUGW.

Aos laboratórios LVV, LMP e LBE pela disponibilidade de infraestrutura laboratorial e equipamentos utilizados durante análise dos experimentos.

Aos meus familiares que não mediram esforços para me apoiar e contribuir na realização de minha formação pessoal e acadêmica, em especial aos meus pais Silenio e Josiana por todo amor, carinho e apoio incondicional.

Ao meu marido Leonardo por encarar comigo os desafios de se construir uma carreira acadêmica, por todo o amor e apoio demonstrados no decorrer dessa caminhada.

RESUMO

O *Zika vírus* é um flavivírus que tem sido objeto de grande preocupação mundial devido sua associação com casos de malformações congênitas e doenças neurológicas graves como a microcefalia e a síndrome de *Guillain-Barré*. O vírus já foi reportado em mais de 80 países e continua a se espalhar geograficamente. A eminência de possível reincidência em regiões já afetadas pelo vírus tem gerado preocupações. Apesar do grande acervo científico adquirido após a declaração de estado de emergência feita pela Organização Mundial de Saúde em 2016 ainda não existem vacinas nem tratamentos aprovados para uso em humanos contra o *zika vírus* (ZIKV). Buscando desenvolver uma estratégia alternativa capaz de avaliar compostos que apresentassem atividade antiviral e efeito citoprotetor, desenvolvemos um bioensaio baseado na utilização de células repórter. Estas células repórter, permissíveis à infecção por ZIKV, são geneticamente modificadas para expressão citoplasmática de GFP, possibilitando-se a sua detecção por citometria de fluxo. A utilização desse bioensaio possibilitará a avaliação de coleções de compostos candidatos ao desenvolvimento de fármacos, que poderão ser utilizados para prevenção e tratamento de infecções pelo ZIKV. Com alvo de explorar a funcionalidade de nosso bioensaio realizamos testes com fármacos já utilizados para outras finalidades terapêuticas, como Proclorperazina, Amodiaquina, Quinacrina, e Berberina, em comparação ao composto 2'-C-Metilcitidina, já descrito por seu efeito antiviral para inibir ZIKV. Foi possível verificar através de nossos estudos, que os compostos Proclorperazina, Amodiaquina e 2'-C-Metilcitidina conferem citoproteção às células submetidas a infecção com ZIKV. Dessa forma, verificamos a possibilidade de realizar uma avaliação funcional e também uma análise preliminar de citotoxicidade utilizando nosso bioensaio. As informações geradas a partir de nossos estudos, utilizando-se esse modelo de análises *in vitro* de candidatos para interferir na infecção por ZIKV também poderão ser aplicadas para ampliação do conhecimento e exploração de candidatos farmacológicos para inibição do ZIKV ou mesmo de outros novos vírus emergentes que apresentem efeito citopático.

ABSTRACT

Zika virus is a flavivirus that has been the subject of great concern worldwide due to its association with cases of congenital malformations and severe neurological diseases such as microcephaly and *Guillain-Barré* syndrome. The virus has been reported in more than 80 countries and continues to spread geographically. The eminence of possible re-introduction in regions already affected by the virus has raised alarms. Despite the great scientific information acquired after the declaration of a state of emergency made by the World Health Organization in 2016, there are still no vaccines or treatments approved for use in humans against the zika virus (ZIKV). In order to develop an alternative strategy capable of evaluate compounds that presented antiviral activity and cytoprotective effect we developed a bioassay based on the use of reporter cells. These reporter cells, permissible for ZIKV infection, are genetically modified for cytoplasmic expression of GFP, making it possible to detect them by flow cytometry. The use of this bioassay will allow the evaluation of collections of candidate compounds for the development of drugs that can be used for the prevention and treatment of infections for ZIKV. In order to verify the functionality of our bioassay, we performed tests with the drugs used for other therapeutic purposes, such as Prochlorperazine, Amodiaquine, Quinacrine, and Berberine comparing with the 2'-C-Methylcytidine, compound already described for its antiviral effect to inhibit ZIKV. It was possible to verify through our studies that the compounds Prochlorperazine, Amodiaquine and 2'-C-Methylcytidine presented cytoprotective effect to the cells that were submitted to infection with ZIKV. In this way, we verified the possibility of performing a functional evaluation and a preliminary analysis of cytotoxicity using our bioassay. Information acquired from our studies using this model of *in vitro* analysis of candidates that can interfere on ZIKV infection could be also applied to increase knowledge and exploration of pharmacological candidates for inhibition of ZIKV or even other emerging virus that present cytopathic effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Citometria de fluxo representativa da linhagem geneticamente modificadas para expressar o fenótipo GFP	34
Figura 2 - Ensaio dose-resposta associado à carga viral em células Vero-Fugw pool utilizando metodologia de citometria de fluxo	36
Figura 3 - Ensaio de avaliação da atividade citoprotetora ou antiviral do fármaco Proclorperazina em células Vero-Fugw pool.	40
Figura 4 - Ensaio de avaliação da atividade citoprotetora ou antiviral do fármaco Amodiaquina em células Vero-Fugw pool.....	41
Figura 5 - Estudo do efeito do tratamento com fármaco Quinacrina em células não infectadas e infectadas com ZIKV	42
Figura 6 - Ensaio in vitro utilizando citometria de fluxo para avaliar o tratamento com fármaco Berberina em células infectadas e não infectadas com ZIKV	43
Figura 7 - Ensaio de avaliação da atividade citoprotetora ou antiviral do fármaco 2'-C-Metilcitidina em células Vero-Fugw pool.....	44
Figura 8 – Ensaio de formação de placa demonstrou diminuição da carga viral dos sobrenadantes que receberam tratamento com Proclorperazina na concentração de 10 µM..	47
Figura 9 – Ensaio de formação de placa para avaliação do potencial antiviral do composto Amodiaquina.	48
Figura 10 – Titulações dos sobrenadantes das células infectadas e tratadas com o composto 2'-C-Metilcitidina.....	49
Figura 11 - Ensaio de citotoxicidade medido por LDH de células infectadas com ZIKV.....	52
Figura 12 - Ensaio de citotoxicidade medido por LDH de células infectadas com ZIKV e tratadas com compostos químicos.....	53
Figura 13 . Ensaio de screening de biblioteca de compostos para avaliação de potencial citoprotetor e/ou antiviral ao vírus da Zika utilizando células geneticamente modificadas e a ferramenta de citometria de fluxo.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

CMC – Carboximetilcelulose

CNPEM- Centro Nacional de Pesquisas em Energias e Materiais

DENV-2 – Vírus da Dengue sorotipo 2

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

FDA – *Food and Drug Administration*

GFP - *Green Fluorescent Protein*

HCS – *High Content Screening*

HTS - *High Throughput Screening*

LBE- Laboratório de Bioensaios

LDH- Lactato desidrogenase

LMP- Laboratório de manipulação de patógenos

LNBio – Laboratório Nacional de Biociências

LVV- Laboratório de vetores virais

MOI – *Multiplicity of infection*

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCPZ- Proclorperazina

SFB – Soro Fetal Bovino

ZIKV- Vírus da Zika

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
SUMÁRIO.....	12
1.INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Zika vírus: uma questão de saúde pública	14
1.2 Aspectos biológicos e moleculares do Zika Vírus.....	16
1.3 A infecção por Zika vírus está associada ao desenvolvimento de patologias com importância clínica, como a microcefalia e síndrome de Guillain-Barré	17
1.4 Formas de contágio e disseminação do ZIKV	18
1.5 Estado atual no desenvolvimento de vacinas para infecção por Zika Vírus	18
1.6. As medidas terapêuticas para o tratamento da infecção por ZIKV são sintomáticas.	19
1.7. As metodologias de screening possibilitam acelerar a prospecção de novas moléculas com atividade antiviral	21
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAS E MÉTODOS	28
3.1-Vírus	28
3.2-Linhagens celulares	28
3.3- Estabelecimento da linhagem GFP positiva	28
3.4-Teste efeito citopático utilizando a linhagem repórter Vero-FUGW	29
3.5-Teste in vitro para avaliar atividade antiviral e/ou citoprotetora dos compostos químicos Proclorperazina, Amodiaquina, Berberina, Quinacrina e 2'-C-Metilcitidina	29
3.6-Screening de biblioteca de compostos para avaliar atividade antiviral e/ou citoprotetora	30
3.7- Citometria de Fluxo.....	31
3.8- Ensaio de formação de placa - Titulações.....	32
3.9-Ensaio de citotoxicidade por LDH	32
3.10-Análises estatísticas.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Preparação do ensaio in vitro para avaliar citoproteção e/ou inibição da infecção viral: Estabelecimento de células permissíveis GFP positivas.	34
4.2 Avaliação do efeito citopático em função do MOI viral utilizando as células permissíveis Vero-Fugw pool: Ensaio de dose resposta associado à carga viral.	35

4.3 Teste in vitro para avaliar atividade antiviral dos fármacos Proclorperazina (pcpz), Amodiaquina, Berberina, Quinacrina e 2'-C-Metilcitidina.....	37
4.4 Comparação da inibição viral indicada pelo repórter GFP e titulação de partículas virais produzidas por células tratadas.....	44
4.5 Comparação da diminuição do efeito citopático indicada pelo repórter GFP e quantificação da citotoxicidade gerada nas células tratadas.....	49
4.6 Screening de biblioteca de compostos para avaliar atividade antiviral e/ou citoprotetora ao vírus da Zika.	54
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO I.....	72
ANEXO II.....	73
ANEXO III	81
ANEXO IV	83

1.INTRODUÇÃO

1.1 Zika vírus: uma questão de saúde pública

O *Zika vírus* (ZIKV) é um flavivírus pertencente à família *Flaviviridae* que emergiu nos últimos anos no campo científico como alvo de preocupação mundial devido sua associação com casos de malformações congênitas e síndromes neurológicas graves (Gulland, 2016).

Historicamente o vírus foi isolado pela primeira vez há mais de 60 anos em um macaco *Rhesus* na floresta *Ziika* em Uganda, na África (Dick, 1952). Relatos posteriores indicam seu reconhecimento em mosquitos do gênero *Aedes* e sua associação com a Febre do Zika em humanos, uma doença benigna caracterizada por ser assintomática em 80% dos casos (Dick, 1952; Fauci, Anthony S.; Morens, 2010).

Desde sua descoberta pouco conhecimento foi adquirido a respeito do ZIKV, visto que apenas casos esporádicos da doença foram relatados nas regiões da África e Ásia em um período de 50 anos (Barrows et al., 2016). Este quadro apresentou mudança apenas em meados de 2007 quando surtos infecciosos de ZIKV passaram a ser registrados em regiões do pacífico (Duffy et al., 2009; Roth et al., 2014).

O primeiro grande surto infeccioso do vírus da Zika foi relatado na região da Micronésia. Esse conjunto de ilhas localizadas no Oceano Pacífico a oeste das Filipinas teve mais de 70% da sua população infectada pelo vírus. O segundo grande surto infeccioso aconteceu na região da Polinésia Francesa, um conjunto de ilhas localizadas a sudeste da Micronésia, após uma janela de tempo de seis anos. Os registros indicam que cerca de 66% da população foi infectada pelo vírus no período entre 2013-2014. Apesar da grande disseminação infecciosa entre a população o que começou a instigar os pesquisadores foi à observação do aumento dos casos de síndrome de *Guillan-Barré* (GBS) verificados na região da Polinésia Francesa em paralelo a epidemia viral por ZIKV, setenta e três casos de GBS foram reportados durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa, uma quantidade bem acima da faixa normal de ocorrências deste tipo de síndrome neurológica na região (Fontes, Dos Santos, & Marchiori, 2016).

A epidemia viral de ZIKV atingiu o Brasil no ano de 2015 sendo registrado como o terceiro grande surto infeccioso. Devido o país ser endêmico para o mosquito *Aedes aegypti*, o principal agente transmissor do vírus da Zika, a epidemia se alastrou rapidamente pelo país sendo estimados cerca de 1,5 milhões de casos de infecção nesse período. Contudo, o fator que chamou a atenção de entidades mundiais para o surto no Brasil foi o aumento em cerca de 20

vezes do número de casos de microcefalia em algumas regiões de epidemia de Zika no país, indicando uma possível correlação entre esses casos (Schuler-Faccini et al., 2016).

Após o surto no Brasil, o vírus se espalhou rapidamente entre o continente Americano, causando um grande aumento no número de infecções por ZIKV em países da América Latina e Central (Lessler et al., 2016). O surto infeccioso registrado na Colômbia mostrou, assim como no Brasil, um aumento muito grande nos casos relatados de microcefalia e síndromes neurológicas graves sustentando a hipótese de uma correlação entre as patologias (Pacheco et al., 2016; Rica & Lucia, 2016).

Os crescentes casos de microcefalia e síndrome de *Guillain-Barré* nas regiões afetadas pelo ZIKV fizeram com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarasse em fevereiro de 2016 estado de preocupação emergencial, incentivando grupos de pesquisa a estudarem e entenderem os mecanismos de funcionamento do ZIKV, as correlações entre os casos de infecção com vírus e o desenvolvimento de doenças neurológicas e os possíveis mecanismos de tratamento (Gulland, 2016).

Em consequência a declaração da OMS se desenvolveu um grande acervo científico que pesquisou e introduziu conceitos importantes com relação ao ZIKV. Dentre esses conceitos, foi demonstrado, através de estudos de casos na região brasileira, a correlação entre a infecção de gestantes e o desenvolvimento de fetos com microcefalia, assim como a confirmação dessa correlação através de modelos animais (de Araújo et al., 2016; Fernandes et al., 2016; King, n.d.; Miner et al., 2016; Xavier-Neto et al., 2017). Foi possível demonstrar o tropismo do vírus para células neuroprogenitoras e para células da barreira hemato-placentária indicando a forma de entrada e infecção do vírus no organismo que levariam aos problemas agravantes da doença, como as malformações congênitas (Ferreira de Lima Neto et al., 2017; Miner & Diamond, 2017; Simonin et al., 2016; Suter & Aagaard, 2016). Buscou-se pesquisar as possíveis interações entre vírus e hospedeiro, procurando-se quais os receptores celulares que possibilitariam a entrada do vírus na célula, entre outras informações relevantes (R Hamel et al., 2015; Li et al., 2017; Wang et al., 2017).

Atualmente o vírus já foi reportado em 84 países ao redor do mundo, destes 31 apresentaram um aumento nos casos de microcefalia correlacionados com a infecção por ZIKV e 24 países relataram um aumento nos casos de síndromes neurológicas decorrentes da infecção. Segundo dados da OMS o vírus continua a se espalhar geograficamente e apesar do número de infecções ter diminuído de forma significativa em regiões como o Brasil e o próprio continente Americano no ano de 2017 a vigilância e prevenção contra esse patógeno continuam altas visto a possibilidade de sua reincidência ((WHO) World Health Organization, 2017).

1.2 Aspectos biológicos e moleculares do Zika Vírus

O *Zika virus* pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Outros vírus como o da Dengue, Encefalite japonesa, Febre amarela e o vírus do Oeste do Nilo também recebem essa classificação e possuem características em comum como a organização genômica e as estratégias de replicação viral (Rabaan, Bazzi, Al-Ahmed, Al-Ghaith, & Al-Tawfiq, 2016).

Morfologicamente o ZIKV pode ser caracterizado como um vírus de envelope viral formado por uma bicamada lipídica de 50 nm de diâmetro, composto em seu interior por um capsídeo icosaédrico onde o genoma encontra-se inserido (Faye et al., 2014; Kuno & Chang, 2007).

O genoma é constituído de um RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11 kb de comprimento que codifica uma única poliproteína. Esta poliproteína passa por um processo de clivagem dentro da célula gerando 3 proteínas estruturais (C, prM e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Chan, Choi, Yip, Cheng, & Yuen, 2016; Faye et al., 2014; Kuno & Chang, 2007).

As proteínas estruturais estão relacionadas com a formação do envelope e capsídeo viral das novas partículas virais geradas após o processo de replicação no interior das células, enquanto que as proteínas não estruturais apresentam funcionalidades diversas que vão desde o envolvimento de forma essencial nos processos de replicação e empacotamento, até o desempenho de papéis importantes na evasão da resposta imune celular (McArthur, 2017).

Dentre essas, a proteína de envelope E é a proteína de superfície do *virion* mais abundante e está envolvida na execução das principais funções biológicas do vírus como na ligação com receptores da célula e no processo de fusão/entrada do vírus nesta, sendo assim um importante alvo de pesquisas terapêuticas (Chan et al., 2016; Faye et al., 2014; Kuno & Chang, 2007).

Da mesma forma, as proteínas NS3 e NS5 também tem se destacado como alvos terapêuticos em virtude dos seus papéis enzimáticos característicos fundamentais para a replicação e desenvolvimento de novas partículas virais. A proteína NS3 é a principal responsável pelo processamento das poliproteínas precursoras na fase citosólica e possui funcionalidade na replicação viral, enquanto a NS5 constitui a polimerase responsável pelo processo de replicação viral e possui ação antagonista de *Interferon* extremamente importante para evasão da resposta imune. Essas proteínas constituem as estruturas mais conservadas entre as espécies de flavivírus (McArthur, 2017).

Existem duas linhagens principais do ZIKV sendo elas a linhagem Africana e a linhagem Asiática (Chan et al., 2016). Estudos genéticos e estruturais sobre essas linhagens demonstraram que a linhagem Asiática apresenta regiões de glicosilação nas proteínas do envelope de forma diferente a sua linhagem precursora africana. Essas diferenças estruturais poderiam estar correlacionadas a diferenças genéticas entre as duas linhagens onde foi verificada a substituição de 16 aminoácidos no genoma precursor e que isso estaria diretamente correlacionado a alterações na virulência e tropismo desses vírus (Rodolphe Hamel et al., 2017; McArthur, 2017).

1.3 A infecção por Zika vírus está associada ao desenvolvimento de patologias com importância clínica, como a microcefalia e síndrome de *Guillain-Barré*

A Febre do Zika caracteriza-se por ser uma infecção sintomática em apenas 20% dos casos, com o aparecimento de sintomas variáveis como febre, conjuntivite, mialgia, dor de cabeça e erupções maculopapulares. Ela é considerada como uma infecção tempo-limitante, onde há o desaparecimento de manifestações clínicas em um período de 3 a 7 dias. A semelhança de suas manifestações clínicas com outros tipos de infecção por *arbovírus*, em especial infecções de Dengue e Chikunguya, tornam difícil a realização de um diagnóstico preciso (Duffy et al., 2009).

A infecção por ZIKV também tem sido associada a dois quadros patológicos extremamente graves, como malformações congênitas e síndromes neurológicas graves, das quais a microcefalia e a síndrome de *Guillai-Barré* se destacam com os maiores números de ocorrências relatados pela organização mundial de saúde ((WHO) World Health Organization, 2017; Soares de Oliveira-Szejnfeld et al., 2016).

A microcefalia pode ser classificada como uma condição rara em que a circunferência da cabeça do bebê é significativamente menor que o normal, sendo um resultado de um mau desenvolvimento do cérebro do feto no período gestacional. Crianças com essa condição irão apresentar problemas como convulsões, deficiência intelectual, problemas de desenvolvimento, atraso nas funções motoras e de fala e deficiências visuais. Já a síndrome de *Guillain-Barré* é considerada uma doença neural aguda, em que células do sistema imune passam a atacar células do sistema nervoso central resultando em deficiências no desenvolvimento sensomotor do paciente. A ausência de tratamento reversível para a condição de microcefalia, assim como os prejuízos e possíveis sequelas geradas após o desenvolvimento de GBS, indicam a necessidade de prevenção e tratamento para o ZIKV (Rabaan et al., 2016).

1.4 Formas de contágio e disseminação do ZIKV

A principal forma de transmissão da infecção de ZIKV é através de mosquitos infectados do gênero *Aedes* (R Hamel et al., 2015). Duas espécies se destacam como os principais vetores competentes de transmissão do vírus, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Esses vetores apresentam um padrão de incidência alta em áreas de regiões climáticas tropical e sub-tropical sendo os responsáveis pela rápida disseminação viral nessas regiões (McArthur, 2017).

Além da veiculação do vírus por mosquito, estudos mostraram que o contágio com ZIKV também poderia ocorrer através de relações sexuais com pessoas infectadas e por meio da transmissão perinatal entre mãe e feto (Lyle Peterson, Jamieson, Powers, & Honein, 2016; Musso et al., 2014).

Dados recentes da literatura sugerem que o controle do mosquito é essencial para reduzir significativamente a incidência da infecção viral, entretanto, considerando-se a gravidade de patologias associadas à infecção viral, tal como microcefalia e GBS, o desenvolvimento de vacinas e terapias antivirais é de grande importância (Zanluca & Nunes, 2016).

1.5 Estado atual no desenvolvimento de vacinas para infecção por Zika Vírus

As vacinas constituem um excelente modelo de proteção preventiva no caso de infecções virais, sendo bastante utilizadas para prevenção contra espécies de flavivírus bem conhecidos como do vírus da Febre Amarela e vírus da Encefalite Japonesa. Inúmeros estudos foram desenvolvidos após a declaração da OMS buscando desenvolver uma plataforma de vacina que eficientemente levasse a proteção da população contra as infecções por ZIKV, contudo esse processo é bastante lento e burocrático, não existindo ainda um modelo acessível para a população (McArthur, 2017).

Segundo dados da OMS cinco candidatos de vacinas para ZIKV, desenvolvidos a partir de diferentes métodos experimentais, encontram-se na primeira fase de testes clínicos atualmente (GLS-5700, VRC ZIKV DNA, AGS-v, MV-ZIKA, Mrna-1325) e um candidato encontra-se na segunda fase de testes clínicos (VRC 705) (World Health Organization(WHO), 2017).

Não obstante os bons resultados apresentados pelos candidatos até então, é importante lembrar que esses estudos não cobrem a avaliação do principal grupo alvo, que seriam mulheres em período gestacional, não se sabendo assim se essa metodologia conseguiria

ser aplicada e garantir proteção da infecção gerada pelo vírus da Zika nesse grupo populacional. Aliados a isso, estimativas apontam que um mínimo de quadro anos de estudos ainda seja necessário até que esses candidatos possam ser direcionados para a população.

Vacinas para flavivírus possuem uma complexidade visto os possíveis problemas associados à disseminação de sorotipos diferentes de uma mesma espécie viral. A exemplo do caso do vírus da Dengue, que é uma flavivírus muito investigado, mesmo após décadas de estudos para o desenvolvimento de vacinas que garantissem proteção à infecção por esse vírus ainda não há um modelo completamente acessível à população mundial (Sun, Li, Wang, Hao, & Jin, 2017; Wichmann et al., 2017). Isso se deve em parte a disseminação de sorotipos diferentes da mesma espécie viral, onde 5 sorotipos diferentes já foram descobertos, e a necessidade de que a vacina garanta proteção a todos os sorotipos verificados, visto que a proteção parcial a esses sorotipos poderia levar ao agravamento da infecção devido ao problema de *antibody dependent enhancement* (ADE) (Mustafa, Rasotgi, Jain, & Gupta, 2015; Sun et al., 2017). Apesar de não se ter conhecimento sobre a disseminação de sorotipos diferentes para o vírus da Zika, esta é uma possibilidade que não deve ser negligenciada, pois assim como o vírus da dengue, o genoma do ZIKV é composto de RNA e está sujeito a inúmeras mutações que viabilizam o surgimento de diferentes cepas, que podem apresentar alterações fenotípicas (Faye et al., 2014; Ye et al., 2016). Além disso, estudos têm indicado que a presença de alguns tipos de anticorpos adquiridos após uma infecção por outras espécies de flavivírus como Dengue ou vírus do Oeste do Nilo poderiam induzir o fenômeno do ADE e levar ao agravamento dos sintomas da Febre do Zika em modelos *in vitro* e *in vivo*, caso comprovado em humanos esse fator aumentaria ainda mais a dificuldade para o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura (Bardina et al., 2017; Richner et al., 2017; Willis & Hensley, 2017).

1.6. As medidas terapêuticas para o tratamento da infecção por ZIKV são sintomáticas.

As medidas terapêuticas disponíveis para a população são apenas de suporte para os pacientes infectados, não havendo nenhum agente antiviral que especificamente combata a infecção por ZIKV (McArthur, 2017). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas neste campo com o intuito de identificar compostos com atividade antiviral contra o vírus da Zika, dentre os compostos que apresentaram resultados satisfatórios em ensaios *in vitro* podemos citar os análogos nucleosídicos NITD008 (Deng et al., 2016), BCX4430 (Julander et al., 2017), 7DMA (7-Deaza-2'-C-Methyladenosine) (Zmurko et al., 2016), e 2CMC (2'-C-Methylcytidine) (Zmurko et al., 2016), além de um composto polifenólico EGCG(-epigallocatechin gallate) que

se encontra em grandes quantidades na composição do chá verde (Carneiro, Batista, Braga, Nogueira, & Rahal, 2016), e o composto *Quercetin* um flavonoide encontrado em abundância em alguns vegetais, frutas e até mesmo no vinho tinto (Wong, 2017).

Apesar dos bons resultados apresentados por esses e outros compostos o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é bastante longo sendo necessário que várias etapas de testes sejam feitas para que o medicamento seja aprovado e direcionado para a população. Devido à urgência de condicionar uma medida terapêutica que garanta a segurança de pelo menos o maior grupo de risco para o ZIKV, que são as gestantes, pesquisas envolvendo medidas como a reorientação do uso de drogas já aprovadas por órgãos de saúde (“*drug-repurposing*”) tem ganhado maior atenção (Cheng, Murray, & Rubin, 2016).

Através do reposicionamento de mercado medicamentos já aprovado por órgãos de saúde passam por um novo processo de *screening* para avaliar seu potencial de ação contra outra doença diferente da qual ele teria sido aprovado (Cheng et al., 2016; Xu et al., 2016). Essa metodologia confere a vantagem de eliminar algumas etapas no processo de descoberta de compostos, visto já se ter noções a respeito da citotoxicidade do composto, quais vias moleculares ele modula, qual a sua cinética de absorção celular, as concentrações máximas e mínimas utilizadas em humanos, além de já se ter indícios de efeitos adversos do composto ao organismo através das informações adquiridas nos estudos clínicos ou em estudos animais. Esses fatores acabam por agilizar os estudos de novos compostos antivirais em casos de surtos virais imprevisíveis que necessitam de uma resposta científica rápida como os do ZIKV (Xu et al., 2016).

Resultados satisfatórios nos estudos de tratamento para o vírus Ebola foram alcançados a partir dessa metodologia durante seu último surto infeccioso, conseguindo identificar através de um único *screening* 53 composto que conseguiam bloquear a progressão da infecção pelo vírus através da modulação de diferentes vias celulares já conhecidas (Kouznetsova et al., 2014).

No caso do ZIKV uma das possíveis vantagens ao se utilizar essa metodologia encontra-se no fato de já se ter acesso a informações sobre possíveis efeitos colaterais do composto, em estudos animais, com relação ao risco gerado pelo tratamento em animais em período gestacional e sua classificação sobre possível desenvolvimento de doenças teratogênicas no feto (Barrows et al., 2016). Essas informações seriam muito importantes, podendo até serem usadas como uma espécie de filtro, uma vez que este seria o principal grupo de ação do medicamento em humanos, e que medicamentos que já apresentassem indícios maléficos nesse sentido poderiam ser descartados.

Inúmeros compostos já foram identificados com relação a sua atividade antiviral para infecções por flavivírus seguindo esse modelo de reposição de mercado. Dentre eles podemos citar os compostos Cloroquina (Delvecchio et al., 2016); Amodiaquina (Balasubramanian, Teramoto, Kulkarni, Bhattacharjee, & Padmanabhan, 2016), Quinacrina (Balasubramanian et al., 2016), Proclorperazina (Simanjuntak, Liang, Lee, & Lin, 2015), Sofosbuvir (Snyder, Goebel, Koide, Ptak, & Kalkeri, n.d.), Ribivarin (Chen, Yokokawa, & Shi, 2015), Daptomicina (Barrows et al., 2016), entre outros. Destes compostos quatro (Cloroquina, Sofosbuvir, Ribivarin, Daptomicina) já foram avaliados com relação ao seu potencial antiviral contra ZIKV e apresentaram resultados interessantes (Munjaj, Khandia, Dhama, & Sachan, 2017).

1.7. As metodologias de *screening* possibilitam acelerar a prospecção de novas moléculas com atividade antiviral

Existem atualmente variadas metodologias de *screening* para descoberta de novos *hits* (candidatos farmacológicos), cada qual irá se adequar de forma a obter os melhores resultados para a sua linha de pesquisa utilizando os equipamentos, materiais e informações acessíveis ao seu laboratório.

Essas metodologias podem ser divididas normalmente em três vertentes principais, os ensaios baseados em células, os ensaios bioquímicos, e os estudos *in silico*. Os ensaios celulares podem identificar inibidores virais de uma maneira ampla, sem a necessidade de se ter conhecimento prévio sobre alvos proteicos específicos do vírus em análise. Além disso, esses ensaios possuem a capacidade de identificar inibidores que estejam relacionados a qualquer etapa do ciclo de replicação viral nas células. Por outro lado, os ensaios bioquímicos são aqueles que visam estudar os inibidores virais focando-se em uma etapa específica do ciclo de replicação viral ou em uma proteína viral característica, sendo necessário dessa forma já se ter informações específicas a respeito do vírus e de suas propriedades funcionais. Já os estudos *in silico* caracterizam-se pelo uso de ferramentas de bioinformática para avaliar o potencial de ligação de bibliotecas de compostos com proteínas-alvo do vírus, só sendo possível realizar essas análises quando as estruturas cristalográficas das proteínas que serão utilizadas como alvos são conhecidas (Beylevel, White, Ayllon, & Shaw, 2014).

Dentre essa gama de plataformas, estudos envolvendo ensaios em cultura de células são largamente informativos para sugerir candidatos terapêuticos. Isso se deve ao fato de que essas metodologias oferecem uma abordagem inicial mais ampla, conseguindo identificar um

maior número de compostos que possuam propriedades inibitórias diversas ao ciclo celular de replicação do vírus. Ao se trabalhar com vírus emergentes existe uma quantidade limitada de conhecimento sobre seus mecanismos de ação, replicação e interações celulares e esse tipo de metodologia consegue adquirir resultados satisfatórios mesmo na ausência dessas informações (Beyleveld et al., 2014).

Além disso, os ensaios em cultura de células também oferecem a vantagem de se trabalhar em um sistema mais próximo de um ambiente fisiológico, possibilitando uma compreensão melhor sobre a interação farmacológica entre o composto e o vírus. Dessa forma, não só aspectos básicos como a atividade inibitória do composto poderiam ser analisados como também suas propriedades citotóxicas, de permeabilidade celular e de tempo de degradação, garantindo a exclusão inicial de compostos que seriam maléficos ou com propriedades não aplicáveis em um contexto de uso em humanos, possibilitando-se um início de estudo “*hit to lead*”, em que compostos provenientes de um *screening* passam agora por ensaios de caracterização (Goebel et al., 2016; Hughes, Rees, Kalindjian, & Philpott, 2011).

O *screening* de novos compostos via ensaios baseados em células podem ser desenvolvidos a partir de diferentes metodologias. Dentre as mais utilizadas podemos citar as metodologias de medida do efeito citopático (CPE) (Zmurko et al., 2016), ensaios de imunofluorescência (Delvecchio et al., 2016), e desenvolvimento de vírus geneticamente modificados para expressar um gene repórter, ou replicons (Xie et al., 2016).

Sendo uma das metodologias mais utilizadas para verificação de compostos com ação antiviral, os testes de efeito citopático (CPE) envolvem a avaliação da viabilidade celular a partir da marcação das células viáveis com corantes. Neste ensaio uma linhagem celular aderente é submetida a um período de tratamento com o composto em análise e infectada com o vírus, após um período de tempo as células que não sofreram efeito citopático do vírus são coradas, analisadas e quantificadas. Este ensaio é amplamente utilizado para se determinar o título viral, por meio da contagem de unidades formadoras de placas de lise, no caso de vírus citopático, como os flavivírus (Beyleveld et al., 2014).

Ensaio como de titulações conseguem mensurar não somente a diminuição do efeito citopático após o tratamento com um composto com ação antiviral, mas também fornecer informações a respeito da carga viral observada em cada condição de tratamento. Ensaio de titulação apresentam como ponto negativo o longo tempo de execução (5 a 7 dias) (McAuley & Beasley, 2016).

Outra metodologia utilizada nos ensaios celulares são os ensaios enzimáticos como MTT, XTT e LDH. Esses ensaios valem-se da ideia da avaliação do efeito citotóxico verificado

nas células após infecção viral através da quantificação de produtos colorimétricos gerados após reações enzimáticas celulares. Compostos como MTT e XTT são considerados sais tetrazólicos, esses sais quando em contato com enzimas celulares podem sofrer redução via NADH e gerar um produto denominado *formazan*, que é um tipo de composto que apresenta coloração em uma escala quantificável através de medidas de absorbância em leitor de placa.

O composto MTT é solúvel as células, e por isso quando adsorvido por células viáveis a reação de redução ocorre e estas passam a apresentar uma coloração no interior de seu citoplasma. As células que passaram por um processo citotóxico não irão apresentar essa coloração por não apresentarem mais uma maquinaria celular funcional capaz de realizar a reação de redução do sal em questão. Ensaios de MTT apresentam um alto potencial citotóxico às células devido à acumulação de *formazan* no interior dessas e por isso não é recomendável em ensaios que exijam um período de incubação de mais de quatro horas. Já o composto XTT não apresenta solubilidade às células em virtude de sua carga negativa e por esse motivo não consegue ser adsorvido por estas. A reação de redução acontece na membrana de células viáveis via transporte de elétrons a partir de NADH gerados pela mitocôndria. Em ambos os ensaios uma maior coloração será observada em tratamentos que resultaram em um maior número de células vivas (Riss et al., 2013).

No ensaio de LDH a medida é baseada na quantidade de enzima Lactato desidrogenase observada no sobrenadante celular após a célula sofrer algum dano em sua membrana celular. A lactato desidrogenase possui a função de converter piruvato em glicose gerando NADH, este NADH será reduzido por outra enzima presente no kit do ensaio e irá transformar um sal tetrazólico em composto *formazan* de forma proporcional a quantidade de enzima LDH observada no sobrenadante em análise. Dessa forma observa-se um aumento de intensidade do sinal colorimétrico nos sobrenadantes das células que apresentaram maior efeito citopático, devido ao extravasamento da enzima lactato desidrogenase (Fotakis & Timbrell, 2006). Apesar de sua aplicabilidade e ausência de toxicidade, os ensaios de LDH apresentam um alto custo financeiro visto ser necessário à utilização de kits comerciais específicos para sua análise (Riss et al., 2013).

Com o advento dos sistemas de *High-Content Screening* que utilizam uma alta tecnologia de imagens para avaliar o fenótipo de células durante um período de tempo selecionado, os experimentos de CPE aumentaram bastante sua sensibilidade e funcionalidade. Nesses experimentos as células tratadas com a biblioteca de compostos e infectadas com o vírus passam por um processo de marcação com corantes nucleares como DAPI e Hoechst e são analisadas e quantificadas com relação a sua viabilidade celular. Esses experimentos

conseguem avaliar importantes aspectos relacionados à morfologia celular e analisar múltiplos estágios celulares em um mesmo experimento. Os ensaios de HCS se tornaram amplamente utilizados em sistemas de *High Throughput Screening*, contudo apresentam como ponto limitativo o seu alto custo de investimento em equipamentos de análise como o sistema *Operetta* (Beyleveld et al., 2014; Garvey et al., 2016).

Os ensaios de imunofluorescência podem ser classificados como outro tipo de metodologia utilizada no *screening* de compostos. Esses ensaios valem-se do uso de anticorpos para marcação de diferentes proteínas que estão envolvidas em diferentes etapas do ciclo de replicação do vírus. Em virtude dos altos custos financeiros dos seus principais reagentes (os anticorpos) esses ensaios são utilizados mais como uma metodologia complementar, visando se analisar a forma como o composto com propriedades antivirais conseguiria inibir a infecção das células, marcando-se proteínas específicas de cada processo (Beyleveld et al., 2014; Pankaj, 2013).

Os avanços nos estudos de biologia molecular e de clonagem possibilitaram que novas metodologias de estudo fossem incorporadas aos ensaios celulares de *screening* de compostos. Uma dessas tecnologias que hoje é bastante empregada no estudo de várias espécies virais é a de construção de vírus recombinantes. A incorporação de genes *reporters* (GFP, Luciferase, β -Galactosidase, etc) no genoma desses vírus possibilitam a análise de parâmetros interessantes do processo infeccioso tanto em modelos de estudo *in vitro* como *in vivo*, sendo possível rastrear e quantificar de uma forma bastante sensível à quantidade de partículas virais em um determinado ensaio.

Como todas as demais metodologias o uso de genes *reporters* em vírus recombinantes também apresentam limitações, dentre elas podemos citar que ao introduzirmos um gene repórter modificações são feitas no genoma viral que podem levar a alterações nos padrões de infectividade, tropismo, e replicação celular. Aliados a isso, ao se trabalhar com *screening* de compostos com partículas virais recombinantes a ação dos compostos sobre essas partículas pode variar quando comparado com a espécie selvagem desse vírus (Xie et al., 2016).

A construção de vírus recombinantes também apresenta limitações. No caso de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* recombinações do genoma são de difícil execução, em grande parte devido à impossibilidade de se executar as metodologias de clonagem em bactérias competentes convencionais (Aubry, Nougairède, Gould, & De Lamballerie, 2015).

No caso do ZIKV algumas plataformas foram desenvolvidas de forma a se tentar tornar o *screening* de compostos químicos o mais específico possível para esta infecção. Estudos como o desenvolvido por Scott Goebel (Goebel et al., 2016), Miao Xu (Xu et al., 2016),

e Xuping xie (Xie et al., 2016) são exemplos de metodologias de *screening* bastante específicas e inovadoras tendo como alvo o ZIKV.

Goebel priorizou a sensibilidade desenvolvendo um ensaio celular que utilizasse *primers* desenhados especificamente para amplificar regiões conservadas de diferentes linhagens de ZIKV e através disso medir a quantidade de genoma viral e os efeitos dos fármacos em análise por RT-PCR. Sua tecnologia ampliou o padrão de sensibilidade conseguindo utilizar MOIs menores do vírus e não mascarar o efeito de antivirais mais fracos, contudo como se baseia em uma medida direta da quantidade de cópias virais encontradas no ambiente celular após um determinado tempo de incubação e tratamento com os compostos em análise essa técnica não consegue verificar fármacos que apresentem apenas efeito citoprotetor às células. Da mesma forma, tecnologias de análise por RT-PCR são bastante onerosas, visto o custo dos kits para realização do ensaio em cada condição de análise (Goebel et al., 2016).

Miao Xu explorou o uso de células humanas progenitoras neurais e o monitoramento de mecanismos complexos ligados ao desenvolvimento do processo de infecção por ZIKV nestas células como o de ativação de caspase-3 para avaliar compostos com atividade antiviral contra ZIKV. Apesar de ser uma metodologia bastante inovadora os reagentes para detecção de ativação de Caspase-3 são bastante onerosos, reduzindo de certa forma sua utilização em estudos em larga escala (Xu et al., 2016).

Xuping Xie desenvolveu uma tecnologia que usa *replicons*, moléculas de RNA viral que passaram por um processo de deleção do genoma em regiões ligadas a genes estruturais. Este modelo de ensaio tem como característica principal a biossegurança, uma vez que os *replicons* não possuem mais seu potencial de replicação viral na célula. Contudo são necessárias várias etapas de clonagem até se obter a molécula de *replicon* de interesse, sendo utilizadas metodologias de difícil execução em espécies de flavivirus, além disso, estudos de *screening* de compostos envolvendo *replicons* não conseguem avaliar compostos que teriam ação nos processos de entrada e liberação de partículas virais nas células (Xie et al., 2016).

Apesar de todos os avanços alcançados neste campo de pesquisa, muito ainda pode ser feito de forma a aumentar ainda mais a eficiência de detecção e descoberta de compostos químicos que apresentem potencial antiviral.

Neste trabalho, desenvolvemos uma nova estratégia para *screening* de compostos antivirais, que permite análise por citometria de fluxo. Em nossa proposta, utilizamos células permissíveis portadoras de gene repórter GFP (*green fluorescent protein*) como biosensores, que indicam o efeito de citotoxicidade viral. Para isso, células VERO foram transduzidas com vetores lentivirais que continham o gene repórter GFP, de expressão citoplasmática,

possibilitando-se a detecção do seu sinal por citometria de fluxo. Levando-se em conta o efeito citopático característico de células infectadas com ZIKV, propomos que quando submetêssemos nossas células geneticamente modificadas à infecção com o vírus da Zika, esta proteína GFP citoplasmática iria extravasar à medida que as células fossem morrendo, e isso poderia ser verificado utilizando a ferramenta de citometria de fluxo onde à medida que o efeito citopático da infecção progredisse seria observada a diminuição do sinal de GFP. No caso de cultivarmos essas células infectadas na presença de compostos com ação antiviral, esperaríamos verificar a preservação na expressão de GFP quando comparado com condições controle onde células infectadas não são tratadas e exibem redução na expressão do repórter. O desenvolvimento de uma nova estratégia de *screening* de compostos utilizando a ferramenta de citometria de fluxo contribuiria para realizar a avaliação de forma mais sensível, por um tempo e custo relativamente reduzidos de compostos com potencial não somente antiviral como também citoprotetor, conseguindo ampliar e aperfeiçoar pontos importantes que apresentam limitações ao trabalharmos com as metodologias disponíveis atualmente.

2. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho é desenvolver uma nova plataforma de *screening* para avaliar a atividade citoprotetora ou antiviral de fármacos, utilizando células permissíveis geneticamente modificadas para expressar o fluoróforo GFP. Para isso, planejamos cumprir as seguintes etapas experimentais:

- 1- Estabelecer linhagens celulares que expressem o gene repórter GFP;
- 2- Avaliar o efeito citopático destas linhagens quando infectadas com o ZIKV, determinando curvas de expansão viral e MOI;
- 3- Realizar ensaios *in vitro* para avaliar atividade antiviral de fármacos descritos na literatura;
- 4- Realizar o *screening* de bibliotecas de compostos.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1-Vírus

As cepas virais de ZIKV (MR766 e HBa) e DENV-2 utilizadas nos experimentos foram doadas pelo colaborador Dr. Rafael Elias Marques, pesquisador do laboratório de manipulação de patógenos (LMP) do LNBio/CNPEM. A cepa MR766 (ATCC® VR-84™) tem origem comercial, enquanto que a cepa HBa (HS-BA-2015) foi isolada a partir do sangue de um paciente infectado com ZIKV durante a epidemia na região da Bahia. A cepa de DENV-2 (ATCC® VR-1584™) tem origem comercial. Todas as amostras virais, com exceção da DENV-2, doadas pelo pesquisador Dr. Rafael Elias passaram por um processo de expansão e titulação em células VERO com o intuito de se gerar um estoque viral próprio que foi utilizado durante todas as fases experimentais. Para a produção do estoque viral as cepas foram passadas em células VERO e os sobrenadantes coletados foram titulados por ensaio de formação de placa. As amostras do estoque foram mantidas em alíquotas de 100µL em freezer -80°C, seguindo todas as medidas de biossegurança. Para as amostras de DENV-2 foi utilizado o estoque gerado pelo pesquisador Dr. Rafael Elias.

3.2-Linhagens celulares

Nos experimentos foram utilizadas as linhagens de células VERO (ATCC® CCL-81™) e Vero Fugw pool (produzida no Laboratório de Vetores Virais). Essas células eram mantidas em placas de 100mm utilizando meio DMEM (Gibco®) suplementados com glutamina e 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®) em estufa 37°C e 5% CO₂ por até 12 passagens.

3.3- Estabelecimento da linhagem GFP positiva

Para o estabelecimento das células permissíveis utilizou-se células VERO (ATCC® CCL-81™) obtidas de colaboradores do Laboratório de Manipulação de Patógenos (LMP)\LNBio, plasmídeo FUGW (L. Naldini, Blomer, Gage, Trono, & Verma, 1996; Luigi Naldini et al., 1996), e vírus produzidos pelo Laboratório de Vetores Virais LVV\LNBio, com protocolo adaptado da literatura (Bajgelman, Costanzi-Strauss, & Strauss, 2003; Strauss, Patrício, de Carvalho, & Bajgelman, 2006). As células foram plaqueadas com uma concentração de 2×10^5 células em placa de 35mm no dia anterior à infecção, foram infectadas utilizando MOI de 10 *overnight* e feita expansão em placas de 60mm e 100mm à medida que

as células adquiriam confluência. Foram realizados ensaios de citometria de fluxo durante cada passagem das células de forma a se avaliar a presença do novo fenótipo nas células.

3.4-Teste efeito citopático utilizando a linhagem repórter Vero-FUGW

Para o teste de efeito citopático foram utilizadas células Vero-Fugw pool (células permissíveis estabelecidas) e VERO parental; e os vírus *zika vírus* HBa, *zika vírus* MR766 e *dengue vírus* 2. As células foram plaqueadas a uma concentração de 2×10^5 células por poço em placa de 24 poços no dia anterior à infecção, infectadas com os respectivos vírus por 2 horas e mantidas em incubação por 72 horas após troca do meio de cultura, para linhagens de ZIKV, e por 96 horas após troca do meio de cultura, para linhagem de DENV, a 37°C em estufa 5% CO₂. Para o plaqueamento foi utilizado meio DMEM acrescido de glutamina e 10% soro fetal bovino, para infecção com vírus utilizou-se meio DMEM acrescido de glutamina e 2% soro fetal bovino. Após o período de incubação a monocamada de células de cada condição era então tripsinizada, fixada em paraformaldeído 4%, ressuspensa em PBS 1x e direcionada para o ensaio de citometria de fluxo.

3.5-Teste *in vitro* para avaliar atividade antiviral e/ou citoprotetora dos compostos químicos Proclorperazina, Amodiaquina, Berberina, Quinacrina e 2'-C-Metilcitidina

O composto Proclorperazina ($C_{20}H_{24}ClN_3S \cdot 2C_4H_4O_4$) foi doado pelo Dr. Eduardo Pagani e pela Dra. Silvana Rocco pesquisadores do LNBio/CNPEM e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). Os compostos Amodiaquina ($C_{20}H_{22}ClN_3O_5 \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$ - #A2799 Sigma-Aldrich) e 2'-C-Metilcitidina ($C_{10}H_{15}N_3O_5$ - #M4949 Sigma) foram comprados da empresa Sigma-Aldrich e diluídos em DMSO, e os compostos Berberina ($C_{20}H_{18}ClNO_4 \cdot xH_2O$ - #14050 Aldrich) e Quinacrina ($C_{23}H_{36}Cl_3N_3O_3$ - #CDS020709 Aldrich) foram adquiridos através da empresa Sigma-Aldrich e diluídos em água mili-Q estéril. Todos os compostos com exceção do Berberina foram mantidos a uma concentração estoque de 10mM em refrigeração de -20°C, Berberina foi mantido em concentração estoque de 2mM.

Nos ensaios de teste dos compostos químicos as células Vero Fugw pool foram plaqueadas a uma concentração de 2×10^5 células por poço em placa 24 poços no dia anterior à infecção (Dia 0). Essas células passaram por um processo de pré-tratamento com o composto químico no dia do plaqueamento, nessa etapa após as células aderirem a placa o meio de cultura era trocado por meio de cultura com o composto químico diluído nas concentrações de 5, 10 e

20 μM para os ensaios com os compostos Proclorperazina, Amodiaquina, 2'-C-Metilcitidina e Berberina e 1.25, 2.5, e 5 μM para o ensaio com o composto Quinacrina. No Dia 1 era realizada a infecção dessas células com as cepas virais de interesse, usando-se dois valores de MOI 0.01 e 0.1. Nessa etapa era efetuada novamente a troca de meio, onde meio DMEM 10% SFB com composto químico era trocado por meio DMEM 2% SFB com composto químico e o vírus de interesse. Essas células eram mantidas em estufa 5% CO_2 a 37°C por um período de 2h e depois disso passavam por mais uma etapa de troca de meio, adicionando às células meio DMEM 2% SFB novo com as diluições dos fármacos apresentadas anteriormente. Os períodos de incubação foram os mesmos utilizados nos testes de efeito citopático, 72 horas para linhagens de ZIKV e 96 horas para DENV. Após o período de incubação era realizada a coleta dos sobrenadantes de todas as condições para posterior ensaio de titulação. A monocamada de células de cada condição era então tripsinizada, fixada em paraformaldeído 4%, ressuspendida em PBS 1x e direcionada para o ensaio de citometria de fluxo.

Os ensaios com os compostos químicos eram realizados para dois grupos de análise, um grupo que apresentava células que foram pré-tratadas e infectadas e outro que continha células pré-tratadas e não infectadas. O objetivo de se utilizar dois grupos era para avaliar não somente a possível ação antiviral e/ou citoprotetora, mas também uma possível citotoxicidade do próprio composto químico nas células em análise.

Os resultados obtidos através da citometria de fluxo foram normalizados em função do grupo controle, no qual as amostras não receberam tratamento com os fármacos e não foram infectadas com os respectivos vírus (colunas brancas da condição 0 μM), e expressos em razão da porcentagem da intensidade de GFP.

3.6-Screening de biblioteca de compostos para avaliar atividade antiviral e/ou citoprotetora

A biblioteca de compostos analisada no *screening* foi doada pela colaboradora Dr. Silvana Rocco pesquisadora do LNBio/CNPEN, contendo 76 compostos químicos sintetizados pela mesma com aplicações diversas. Os compostos foram diluídos em dimeltisulfóxido (DMSO) e mantidos em estoque a uma concentração de 10mM em refrigeração de -20°C .

No ensaio de *screening* da biblioteca, células Vero Fugw pool foram plaqueadas a uma concentração de 2×10^4 células por poço em placa 96 poços no dia anterior à infecção utilizando meio DMEM e 10% SFB. No Dia 1 era realizada a infecção dessas células com a cepa de ZIKV HBa, usando-se o valor de MOI 0.01, e o tratamento dessas células com os

compostos da biblioteca em análise utilizando uma concentração final de 10 μ M de tratamento, utilizando-se nesta etapa meio DMEM e 2% SFB. Essas células eram mantidas em estufa 5% CO₂ a 37°C por um período de incubação de 72h. Após o período de incubação a monocamada de células de cada condição era então tripsinizada, fixada em paraformaldeído 4%, ressuspensa em PBS 1x e direcionada para o ensaio de citometria de fluxo.

Da mesma forma que o ensaio descrito anteriormente, o ensaio de *screening* da biblioteca de compostos era realizado utilizando dois grupos de análise, um grupo que apresentava células que foram apenas tratadas com os compostos químicos e outro que continha células infectadas com o vírus e tratadas com os compostos. O objetivo de se utilizar dois grupos era para avaliar não somente a possível ação antiviral e/ou citoprotetora, mas também uma possível citotoxicidade do próprio composto químico nas células em análise. Foram realizadas triplicatas para cada composto da biblioteca em análise.

Os resultados obtidos através da citometria de fluxo foram normalizados através da divisão dos valores de intensidade de GFP do grupo de células infectadas e tratadas, pelos respectivos valores de intensidade de GFP de cada composto observado no grupo de células não infectadas e tratadas, e expressos em razão da porcentagem da intensidade de GFP.

3.7- Citometria de Fluxo

Os ensaios de citometria de fluxo foram realizados utilizando citômetro Acea-NovoCyte® e *software* NovoExpress® para análise dos resultados dos testes iniciais *in vitro* e citômetro BD-FacsCanto2® e *software* FCS-Express5® para análise dos resultados do *screening* da biblioteca de compostos. A população celular foi selecionada inicialmente em função do seu tamanho por granulosidade celular, uma vez selecionadas foram analisadas com relação a sua fluorescência utilizando filtro FITC (*fluorescein isothiocyanate*). Esse filtro consegue analisar moléculas que apresentam faixa de excitação e emissão de 495 [nm](#)/521 [nm](#), sendo bastante utilizado na realização de análises de compostos com fluoróforo GFP. A determinação dos quadrantes nas populações celulares positivas levou em consideração as células parentais utilizadas como controle negativo, sabendo-se que estas não apresentavam partículas de proteína GFP no interior de seu citoplasma. A quantidade de amostra adquirida pelo citômetro durante o ensaio era a necessária para contabilização de 10000 eventos em cada condição. Os resultados foram analisados pela contabilização da intensidade de GFP em cada amostra, utilizando-se o parâmetro de medida da média aritmética X nos *softwares* dos citômetros.

3.8- Ensaio de formação de placa - Titulações

Essa metodologia foi utilizada com o objetivo de confirmar os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* de avaliação dos compostos químicos que foram analisados por citometria de fluxo. Nesta etapa visou-se analisar se houve diminuição da carga viral nos sobrenadantes tratados com os compostos químicos que foram coletados na etapa final dos ensaios *in vitro*.

As células VERO parentais foram plaqueadas a uma concentração de 2×10^5 célula por poço no dia anterior à infecção em placa de 24 poços. Os sobrenadantes respectivos a cada condição de tratamento foram submetidos a uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-6} que foram então adicionados às células VERO parentais no dia consecutivo ao plaqueamento. Após um período de infecção de duas horas em estufa 37°C 5% CO_2 essas diluições dos sobrenadantes eram retiradas e meio DMEM suplementado com CMC (Carboximetilcelulose) 2% e 2,5% SFB era adicionado a todos os poços da placa de 24 poços. Decorrido um período de incubação de aproximadamente 7 dias essas células eram fixadas com paraformaldeído 10%. Após várias etapas de lavagem para retirada do meio, essas células eram coradas com cristal violeta 1% (#V5265 SIGMA) e as placas de lise podiam ser visualizadas e contabilizadas.

3.9-Ensaio de citotoxicidade por LDH

O ensaio de citotoxicidade por LDH foi realizado com o intuito de confirmar possível atividade citoprotetora contra ZIKV dos compostos químicos que foram visualizadas na metodologia usando citometria de fluxo.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica presente em uma grande variedade de células, ao haver qualquer tipo de dano à membrana celular essa enzima é liberada e pode ser quantificada no meio extracelular utilizando-se kits de reações enzimáticas. A partir dessa quantificação de LDH a porcentagem de citotoxicidade de um tratamento com um composto ou patógeno pode ser então estimada.

Neste ensaio os sobrenadantes que foram coletados na etapa final do ensaio *in vitro* com os compostos químicos, foram analisados quanto a sua citotoxicidade usando kit LDH Pierce da Thermo Fisher Scientific™ (NC: #88953). A metodologia utilizada seguiu o protocolo do kit da Thermo. A placa contendo as amostras foi lacrada com filmes de vedação da Axigen® por questões de biossegurança e sua absorbância analisada em aparelho leitor de fluorescência EnVision disponibilizado pelo laboratório de bioensaios (LBE) – LNBio/CNPEM.

3.10-Análises estatísticas

As análises estatísticas e os respectivos gráficos foram feitos utilizando-se o *software* **Graph Pad Prism 5.0**. Os resultados são expressos em função da média de quadruplicatas ou triplicatas +/- erro padrão da média que foram normalizados em função do grupo controle mock, representado pela coluna de amostras que não foram infectadas e as quais não receberam tratamento com os fármacos em análise (condição de 0 μ M). Os grupos foram analisados com relação a sua variância através do teste *one way* ANOVA (Análise de variância) e submetidos a pós-testes de *Turkey* ou *Dunnett* dependendo do experimento analisado. Consideramos como significativa às análises estatísticas que apontaram $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Preparação do ensaio *in vitro* para avaliar citoproteção e/ou inibição da infecção viral: Estabelecimento de células permissíveis GFP positivas.

A primeira etapa experimental consistiu no estabelecimento de células VERO permissíveis contendo o gene repórter eGFP. Conforme já introduzimos anteriormente, estas células serão utilizadas como um sensor de infecção ou toxicidade viral. No caso de haver infecção e efeito citopático, pressupõe-se que a célula irá lisar e extravasar o GFP citoplasmático. Como o GFP citoplasmático pode ser analisado por citometria de fluxo, podemos avaliar a eficiência de candidatos para inibir a infecção ou mediar citoproteção utilizando este ensaio repórter baseado em citometria de fluxo.

Sendo assim, estabelecemos um pool de células Vero- Fugw permissíveis (que apresentam o gene repórter eGFP a comando de um promotor/*enhancer* ubiquitina), através da transdução com um vetor lentiviral. A expressão dessa proteína na célula foi medida através da realização de citometria de fluxo convencional. O sinal de GFP possibilitou quantificar a porcentagem de células transduzidas e que passaram a expressar esse novo fenótipo GFP(+) no seu citoplasma.

Efetuamos a transdução de células VERO com o vetor lentiviral recombinante FUGW, utilizando um MOI de 10. Estas células transduzidas foram denominadas Vero-FUGW pool, verificando-se cerca de 62% de positividade para expressão do repórter (Figura 1).

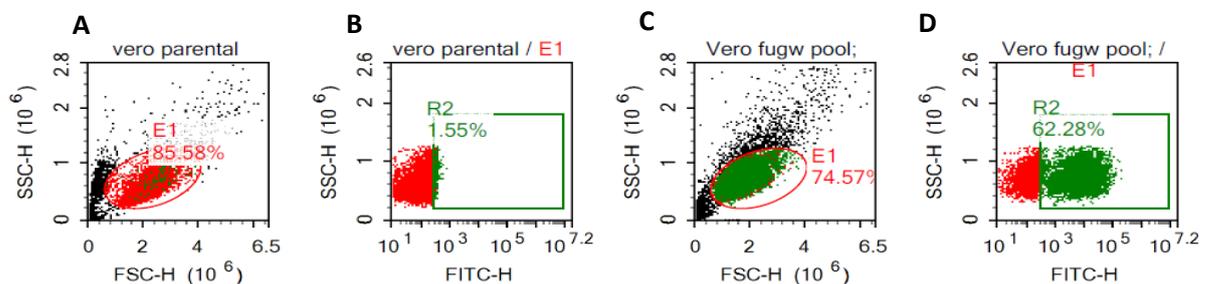


Figura 1– Citometria de fluxo representativa da linhagem geneticamente modificadas para expressar o fenótipo GFP. A população celular foi selecionada inicialmente em função do seu tamanho (SSC-H) por granuloseidade celular (FSC-H), uma vez selecionada a população as células foram analisadas com relação a sua fluorescência utilizando filtro FITC. Células parentais (Mock) foram utilizadas como controle negativo para o estabelecimento dos quadrantes das células positivas. Citometria de células mostrando a expressão de gene GFP nas células Vero-Fugw pool. Os gráficos A e B mostram células VERO- parental utilizadas como controle para determinação dos quadrantes. Os gráficos C e D mostram células Vero-Fugw pool com presença de 62,28% do fenótipo.

4.2 Avaliação do efeito citopático em função do MOI viral utilizando as células permissíveis Vero-Fugw pool: Ensaio de dose resposta associado à carga viral.

O alvo central deste projeto consiste em desenvolver um novo teste para avaliação da eficiência de fármacos, assim como analisar estratégias para inibir infecção por *zika vírus* ou mesmo mediar citoproteção. O princípio de nosso ensaio se baseia na medida do GFP citoplasmático das células permissíveis que são desafiadas com o vírus. Sendo assim, quanto maior a carga viral ou efeito citopático, menor deve ser o sinal de GFP observado.

Um ponto crítico em nosso ensaio consistiu em determinar alguma relação de dose/resposta da medida de GFP em função do efeito citopático ou citotóxico mediado pela carga viral. Para isso, realizamos um ensaio de infectividade com células Vero-Fugw pool. Neste ensaio infectamos células Vero-Fugw pool em placa de 24 poços utilizando diferentes MOIs e pudemos observar uma dose resposta. Estabelecemos um tempo de 72 horas de incubação para infecções por cepas de *Zika vírus* (MR766 e HBa) e 96 horas de incubação para infecções com a cepa de *Dengue vírus* –2. As diferenças nos tempos de incubação se devem a cinética diferente observada pelos vírus em ensaios preliminares. Os resultados podem ser observados através da figura 2 ilustrada abaixo.

Através dos resultados obtidos nestes ensaios, verificamos a possibilidade de utilizar a linhagem Vero-Fugw pool como um sensor do efeito citotóxico/citopático mediado pelos *flavivírus* avaliados, pois verificamos uma consistência e reprodutibilidade nas relações dose/resposta proporcionais ao incremento da carga viral para todas as cepas virais testadas.

Pensando-se na utilização deste ensaio para avaliação de fármacos candidatos para citoproteção ou inibição de ZIKV ou DENV, o efeito terapêutico deveria ser evidenciado pelo resgate na expressão de GFP das células infectadas, comparando-se com células infectadas sem tratamento, de forma análoga ao que observamos quando reduzimos o MOI de vírus nestes ensaios.

Além disso, esse ensaio dose/resposta também possibilitou escolher quais os parâmetros (como MOI e tempo de incubação) que seriam mais adequados para posterior emprego nos testes *in vitro* para avaliação da atividade citoprotetora/antiviral dos fármacos. Decidimos escolher MOIs que induzissem cerca de 80% de morte celular. A importância dessa escolha consiste em verificar qual a quantidade de partícula viral por célula que seria necessária para que fosse constatada a atividade citopática do vírus da mesma forma que esta quantidade não gerasse um efeito citopático tão agressivo de forma que nenhum sinal de GFP pudesse ser observado após 72 horas de infecção para ZIKV e 96 horas para DENV. Assim no nosso caso, os MOIs que reduziam a quantidade de células em aproximadamente 70%-80% foram os

selecionados para a etapa posterior. No caso de utilizarmos fármacos inibidores ou citoprotetores ao vírus, esperaríamos resgatar a expressão de GFP, conforme exploraremos mais adiante.

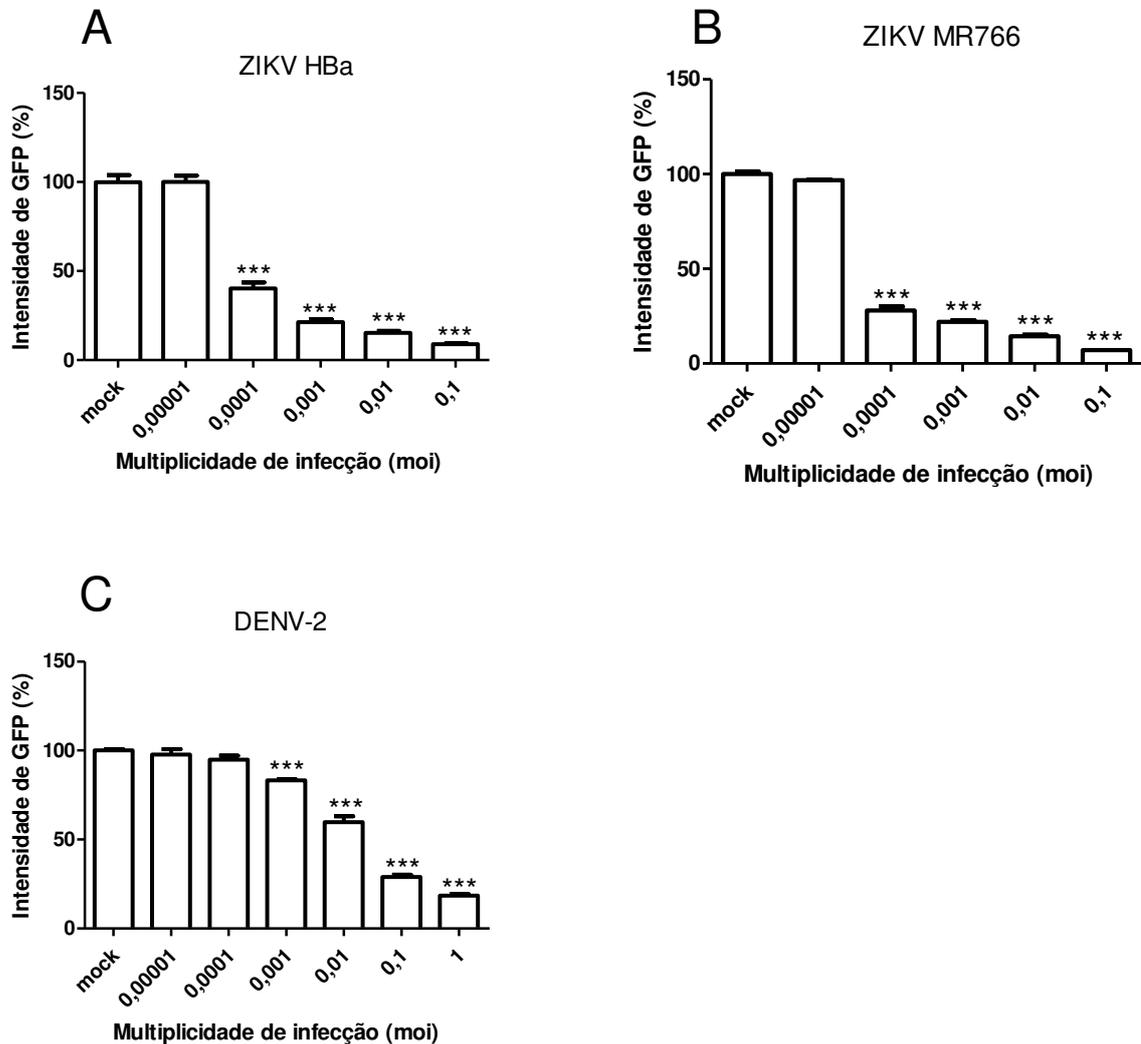


Figura 2- Ensaio dose-resposta associado à carga viral em células Vero-Fugw pool utilizando metodologia de citometria de fluxo. Células Vero-Fugw pool foram infectadas com as cepas de ZIKV HBa (A), ZIKV MR766 (B) e DENV-2 (C) utilizando diferentes MOIs a fim de ser simulado uma interação dose – resposta relacionada ao aumento da carga viral. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 72h para ZIKV HBa , ZIKV MR766 e 96h para DENV-2, sendo realizada citometria de fluxo após os respectivos períodos de incubação. A viabilidade celular foi determinada medindo-se a intensidade de GFP expressa em cada condição e comparadas com as células não infectadas (mock). Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. *** e ** P<0,05 relativo ao grupo controle Mock. Gráficos representativos de 1 experimento. Mock= células não infectadas.

4.3 Teste *in vitro* para avaliar atividade antiviral dos fármacos Prochlorperazina (pcpz), Amodiaquina, Berberina, Quinacrina e 2'-C-Metilcitidina

Uma vez que todos os parâmetros para a realização do ensaio *in vitro* foram estabelecidos foram realizados diferentes testes envolvendo compostos químicos que apresentaram na literatura potencial antiviral contra outras espécies de *Flavivírus*. Esses ensaios foram efetuados com o intuito tanto de realizar a prova de conceito da metodologia, quanto de iniciar a investigação de compostos que apresentariam alguma atividade antiviral ou citoprotetora contra ZIKV.

Optamos por iniciar nossos testes utilizando um fármaco descrito na literatura por apresentar efeito antiviral contra outra espécie de *flavivirus*, sugerido pelo Dr. Eduardo Pagani, LNBio - CNPEM. O Dr. Pagani já tinha indícios na literatura que embasavam a atividade do PCPZ para inibição de DENV-2 (Simanjuntak et al., 2015) e ao saber que estávamos desenvolvendo uma plataforma para *screening* de compostos antivirais solicitou que avaliássemos a eficiência inibitória do PCPZ em nossos ensaios. Assim, em um primeiro ensaio procuramos avaliar a atividade antiviral de PCPZ para inibir infecção desencadeada pelas cepas ZIKV-MR766 (africana), ZIKV-HBa (brasileira) e DENV-2.

A partir de estudos de bioinformática encontrados na literatura optamos por analisar além do PCPZ os compostos Amodiaquina, Quinacrina e Berberina. O Estudo de bioinformática dirigido por Sahoo e colegas demonstrou através da análise de *dockings* que assim como o PCPZ esses outros fármacos, já aprovados pelo FDA, apresentariam interação com a proteína NS3 e desta forma poderiam atuar como inibidores na infecção por ZIKV (Sahoo, Jena, Daf, & Kumar, 2016). Com alvo de testar essa hipótese em experimentos *in vitro*, realizamos os ensaios seguindo nossa metodologia.

Entendendo-se que nenhum desses compostos já havia sido descrito na literatura por apresentar atividade antiviral específica para ZIKV, optamos por testar em nossa metodologia também um composto químico que já apresentasse na literatura indícios da atividade antiviral contra ZIKV. O composto 2'-C-Metilcitidina foi então selecionado por corresponder a esses quesitos para os estudos posteriores (Zmurko et al., 2016).

Os ensaios seguiram os padrões estabelecidos nos ensaios de efeito citopático, utilizando tempo de incubação de 72 horas para as linhagens de ZIKV e 96 horas para o DENV. Os MOIS selecionados foram de 0,1 e 0,01 para infecção com ZIKV HBa; ZIKV MR766; e DENV-2. Todas as condições foram analisadas utilizando-se quadruplicatas, e para cada

concentração testada do fármaco realizou-se controles a fim de se verificar efeitos citotóxicos do fármaco às células.

-Avaliação do efeito inibitório da Proclorperazina

Os resultados verificados através da figura 3 mostram que o fármaco Proclorperazina apresenta potencial antiviral para as cepas de ZIKV HBa e ZIKV MR766, conseguindo preservar a expressão de GFP em células infectadas a partir de uma concentração de 10 μ M. O composto conseguiu demonstrar uma diminuição do efeito citopático mesmo utilizando-se MOIs maiores, que geralmente apresentam uma resposta mais agressiva. Observamos uma significativa toxicidade do composto nas concentrações de 20 μ M, indicadas pela redução na expressão de GFP no grupo pré-tratado e não infectado. Contradizendo dados da literatura (Simanjuntak et al., 2015), não foram observados sinais de diminuição de infecção nos ensaios com DENV-2, utilizando nosso ensaio *in vitro*.

-Avaliação do efeito inibitório da Amodiaquina

Os ensaios realizados com o composto Amodiaquina demonstraram assim como para o PCPZ o possível potencial de atividade antiviral ou citoprotetora do composto contra ZIKV HBa e ZIKV MR766. O tratamento das células com o fármaco demonstrou resgatar os valores iniciais de intensidade de GFP nas concentrações de 10 e 20 μ M (Figura 4) apresentando uma diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo que foi infectado e não foi tratado com o composto. Esse resgate do sinal de GFP foi observado tanto nas células infectadas com MOI de 0,01 quanto para as células infectadas com MOI dez vezes mais forte. Ao contrário do que foi observado com o composto PCPZ, as células tratadas com Amodiaquina não apresentaram padrões de citotoxicidade tão significativos utilizando-se a concentração de 20 μ M.

-Avaliação do efeito inibitório da Quinacrina

Os ensaios iniciais com o composto Quinacrina demonstraram que este fármaco candidato foi extremamente tóxico às células na faixa de concentrações utilizadas nos ensaios anteriores de 5, 10, e 20 μ M (Figura 5 – A e B) não sendo possível desta forma avaliar sua capacidade antiviral e citoprotetora contra ZIKV. A citotoxicidade do fármaco pode ser verificada ao analisarmos as colunas brancas dos gráficos A e B da figura 5 onde há um decréscimo em mais de 90% da expressão do sinal de GFP quando comparado com o grupo controle que não recebeu tratamento representado pela coluna branca de 0 μ M. Tendo-se isso em vista foi realizado outro ensaio utilizando-se concentrações abaixo da faixa que estávamos trabalhando,

sendo estabelecidos novos valores de 1.25, 2.5, e 5 μM de fármaco. Os resultados referentes a esse ensaio podem ser visualizados nas figuras 5C e 5D. Observamos uma inconstância com relação à concentração de 5 μM , visto que no segundo ensaio não foi possível observar um decaimento no sinal de GFP associado a citotoxicidade nas mesmas porcentagens que o primeiro ensaio, ao contrário disso observamos através dos ensaios de citometria de fluxo que o fármaco ao ser adsorvido pelas células ampliava o sinal de fluorescência destas, mascarando o resultado da medida de intensidade de GFP nas células tratadas com o composto. Isso pode ser analisado ao olharmos para as colunas brancas das figuras 5C e 5D onde a medida que se aumenta a quantidade de fármaco, aumenta-se a porcentagem do sinal de GFP. Desta forma optamos por não seguir com os experimentos para esse composto entendendo que ele não se enquadrava dentro da nossa metodologia em virtude da sua capacidade de mascarar o sinal de fluorescência nos ensaios.

-Avaliação do efeito inibitório da Berberina

Os ensaios utilizando o composto Berberina para tratamento de células infectadas com ZIKV HBa e ZIKV MR766 demonstraram que esse composto não apresenta atividade citoprotetora ou antiviral eficiente. Não sendo possível verificar variações expressivas no sinal de GFP das células tratadas e infectadas com as duas linhagens de ZIKV nas diferentes concentrações observadas na figura 6. O tratamento utilizando a concentração de 20 μM apresentou uma diferença de apenas 10% nas células infectadas com ZIKV HBa (Figuras 6A e 6B) quando comparado ao grupo sem tratamento. Apesar da literatura sugerir efeito antiviral *in silico*, (Sahoo et al., 2016) não conseguimos observar isso em nosso modelo *in vitro*.

-Avaliação do efeito da 2'-C-Metilcitidina

O composto 2'-C-Metilcitidina apresentou em nossa metodologia propriedades citoprotetoras às células infectadas com ZIKV HBa. Os resultados visualizados na figura 7A e 7B demonstram que assim como o fármaco Amodiaquina o composto 2'-C-Metilcitidina foi capaz de proteger as células infectadas que foram tratadas com as concentrações de 10 e 20 μM do composto. Esse fato pode ser verificado através do resgate dos valores de intensidade de GFP em valores próximos aos das células não infectadas. Contrariando os dados da literatura não foi possível verificar o mesmo padrão de citoproteção para as células infectadas com a cepa de ZIKV Africana MR766 (Figuras 7C e 7D) (Zmurko et al., 2016).

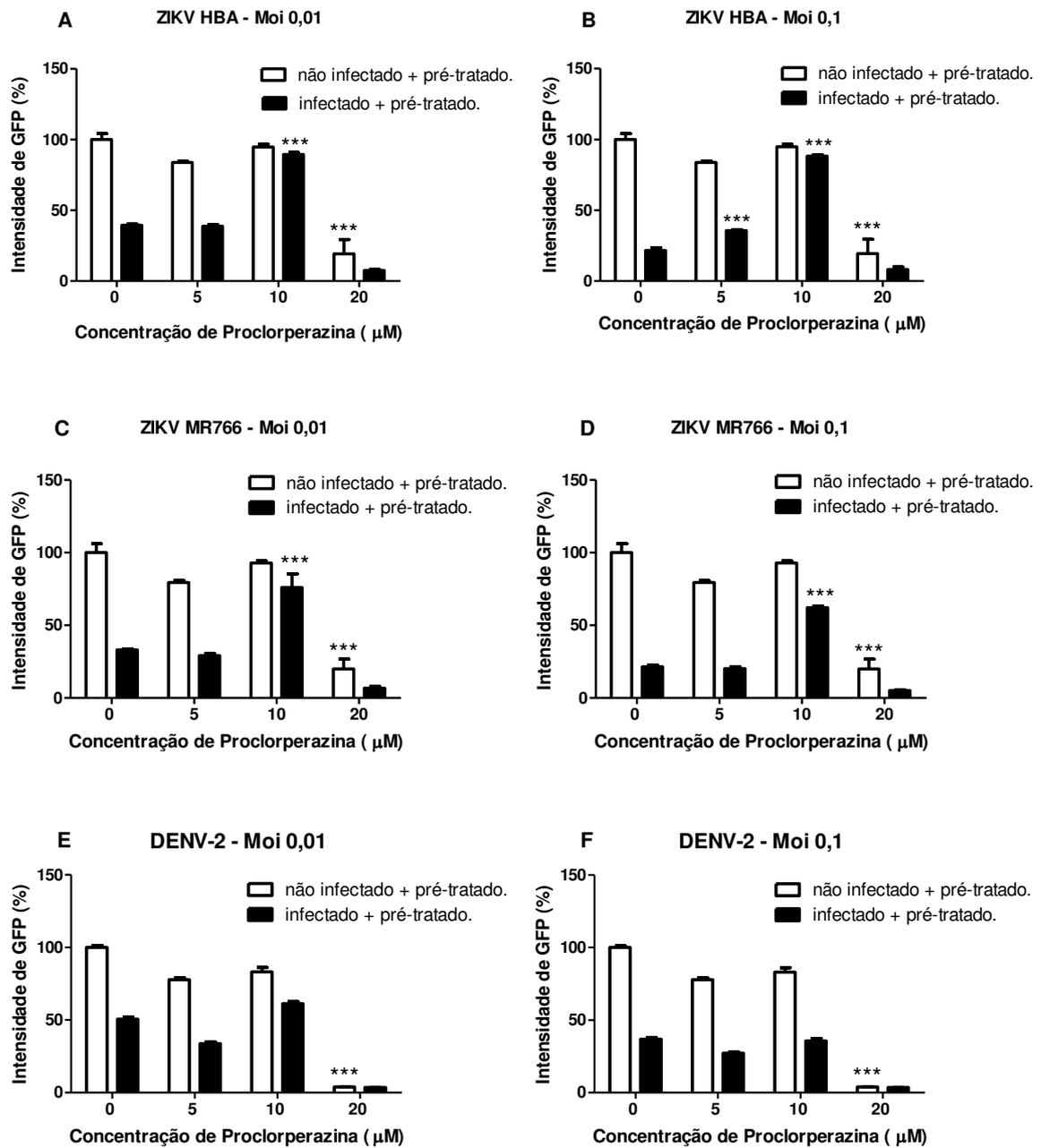


Figura 3- Ensaio de avaliação da atividade citoprotetora ou antiviral do fármaco Proclorperazina em células Vero-Fugw pool. Células Vero Fugw pool foram infectadas com as cepas de ZIKV HBA (A-B), ZIKV MR766 (C-D) e DENV-2 (E-F) utilizando MOI 0,01 e 0,1 com o objetivo de verificar potencial citoprotetor ou antiviral do composto nas concentrações de 5, 10 e 20 µM. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 72h para ZIKV HBA, ZIKV MR766 e 96h para DENV-2, sendo realizada citometria de fluxo após os respectivos períodos de incubação. A medida da intensidade de GFP expressa em cada condição funciona como indicativo da viabilidade celular nesse modelo experimental. Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. *** P<0,0001 e ** P< 0,001 relativo ao grupo controle 0 (Coluna Preta para análise do grupo “infectado + pré-tratado” e Coluna Branca para análise do grupo “não infectado + pré-tratado”). Os resultados foram normalizados em função do grupo controle (coluna branca 0 µM). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

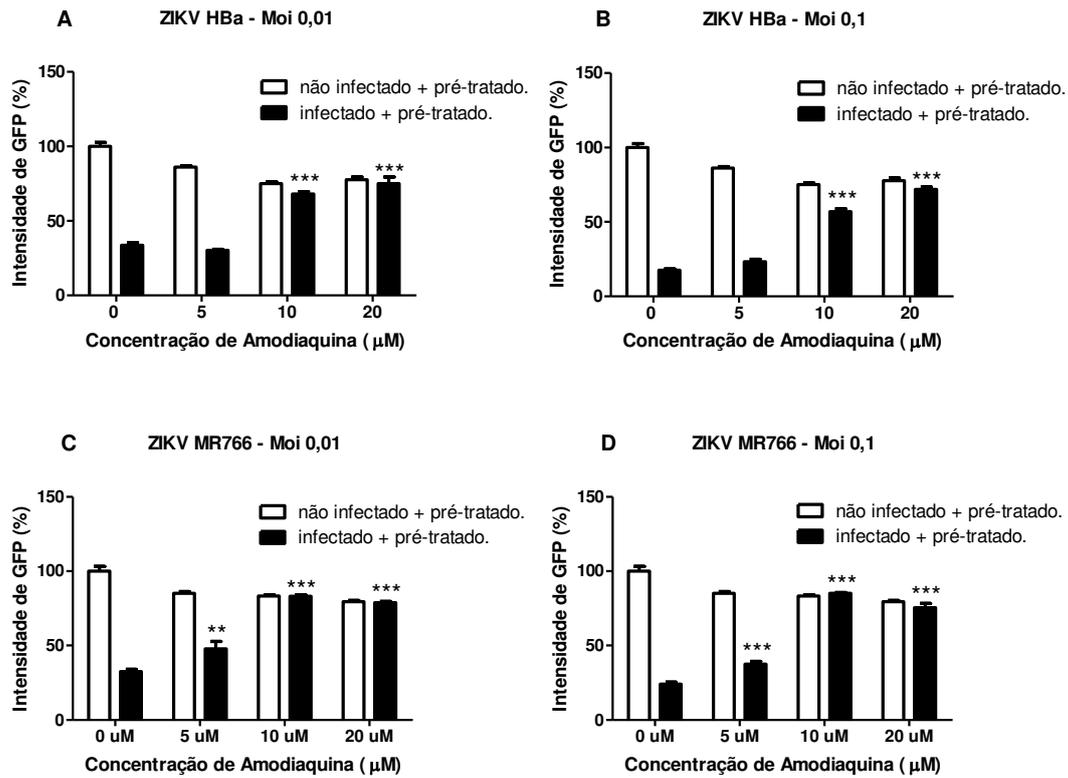


Figura 4- Ensaio de avaliação da atividade citoprotetora ou antiviral do fármaco Amodiaquina em células Vero-Fugw pool. Células Vero Fugw pool foram infectadas com as cepas de ZIKV HBa (A-B), ZIKV MR766 (C-D) utilizando MOI 0,01 e 0,1 com o objetivo de verificar potencial citoprotetor ou antiviral do composto Amodiaquina nas concentrações de 5, 10 e 20 μM. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 72h para ZIKV HBa e ZIKV MR766, sendo realizada citometria de fluxo após o período de incubação. A medida da intensidade de GFP expressa em cada condição funciona como indicativo da viabilidade celular nesse modelo experimental. Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. *** P<0,0001 e ** P< 0,001 relativo ao grupo controle 0 (Coluna Preta) em que as células foram apenas infectadas e não tratadas. Os resultados foram normalizados em função do grupo controle onde as células não receberam tratamento e não foram infectadas com os vírus (coluna branca 0 μM). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

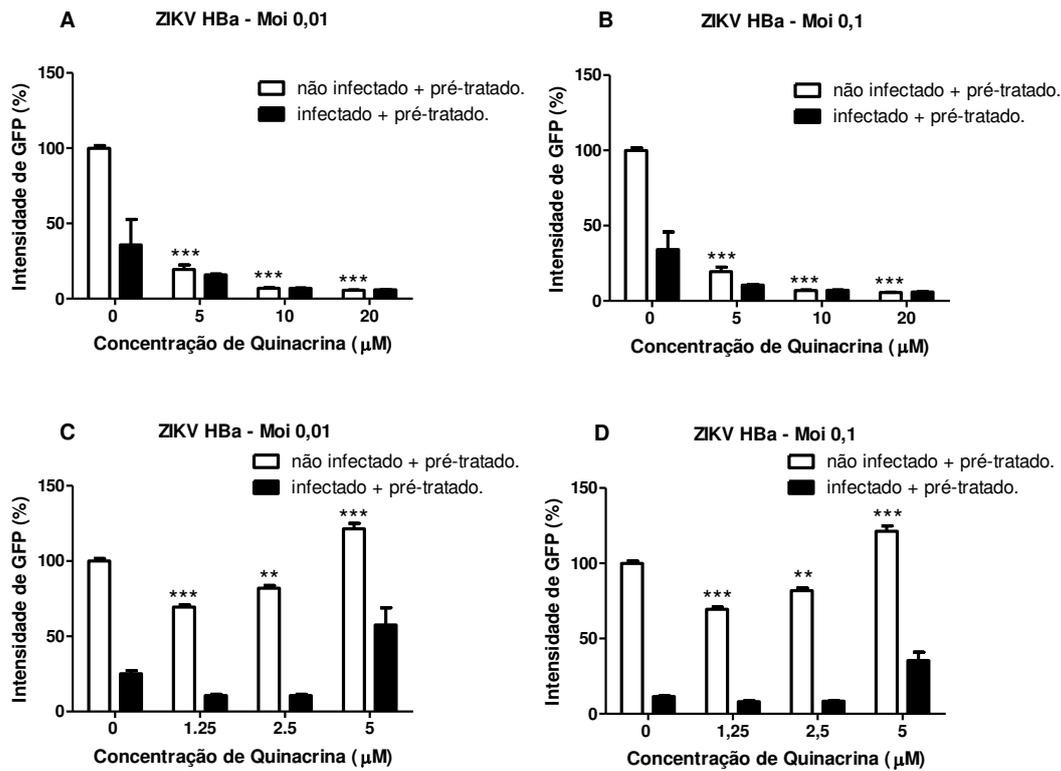


Figura 5- Estudo do efeito do tratamento com fármaco Quinacrina em células não infectadas e infectadas com ZIKV. Células Vero Fugw pool foram infectadas com ZIKV HBa utilizando MOI 0,01 e 0,1 com o objetivo de verificar potencial citoprotetor /antiviral e analisar citotoxicidade do composto nas concentrações de 5, 10 e 20 µM (A-B) e 1,25, 2,5, e 5 µM (C-D). As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 72h, sendo realizada citometria de fluxo após o período de incubação. A medida da intensidade de GFP expressa em cada condição funciona como indicativo da viabilidade celular nesse modelo experimental. Os resultados foram normalizados em função do grupo controle onde as células não receberam tratamento e não foram infectadas com os vírus (coluna branca 0 µM). Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. *** $P < 0,0001$ e ** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle 0 (Coluna Branca) do grupo “não infectado + pré-tratado ” em que as células não foram tratadas. Gráficos representativos de 1 experimento.

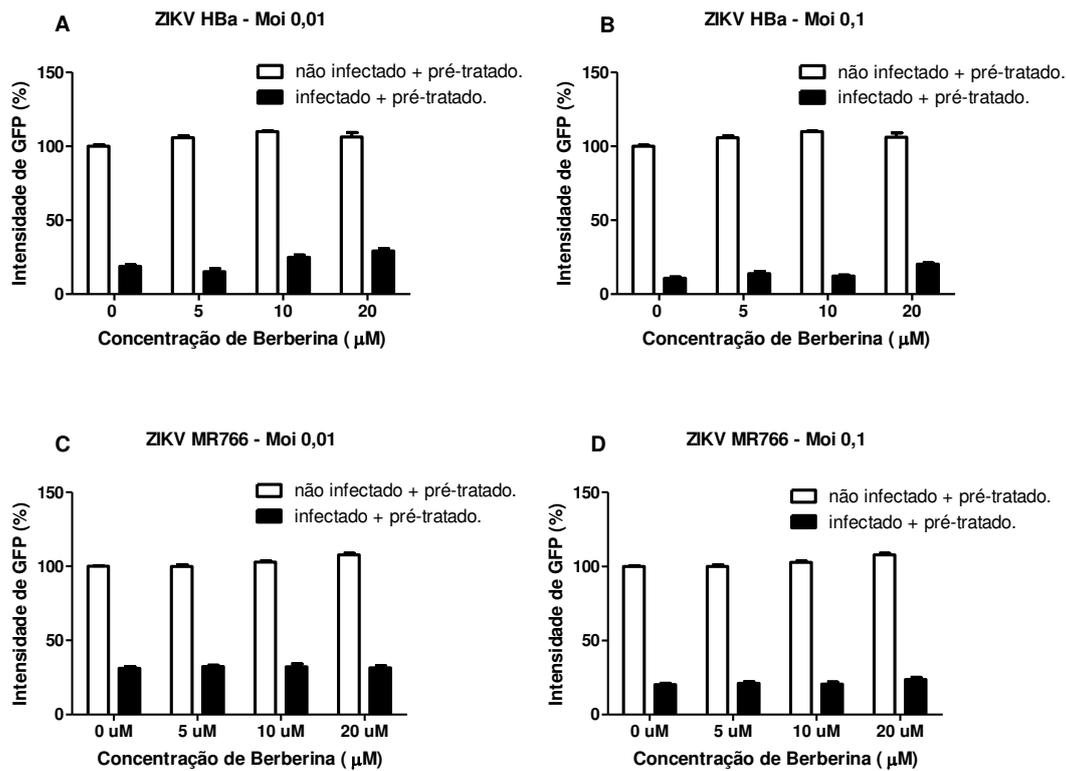


Figura 6- Ensaio in vitro utilizando citometria de fluxo para avaliar o tratamento com fármaco Berberina em células infectadas e não infectadas com ZIKV. Células Vero Fugw pool foram infectadas com as cepas de ZIKV HBA (A-B), ZIKV MR766 (C-D) utilizando MOI 0,01 e 0,1 com o objetivo de verificar potencial citoprotetor ou antiviral do composto Berberina nas concentrações de 5, 10 e 20 µM. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 72h para ZIKV HBA, ZIKV MR766, sendo realizada citometria de fluxo após o período de incubação. A medida da intensidade de GFP expressa em cada condição funciona como indicativo da viabilidade celular nesse modelo experimental. Os resultados foram normalizados em função do grupo controle onde as células não receberam tratamento e não foram infectadas com os vírus (coluna branca 0 µM). Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

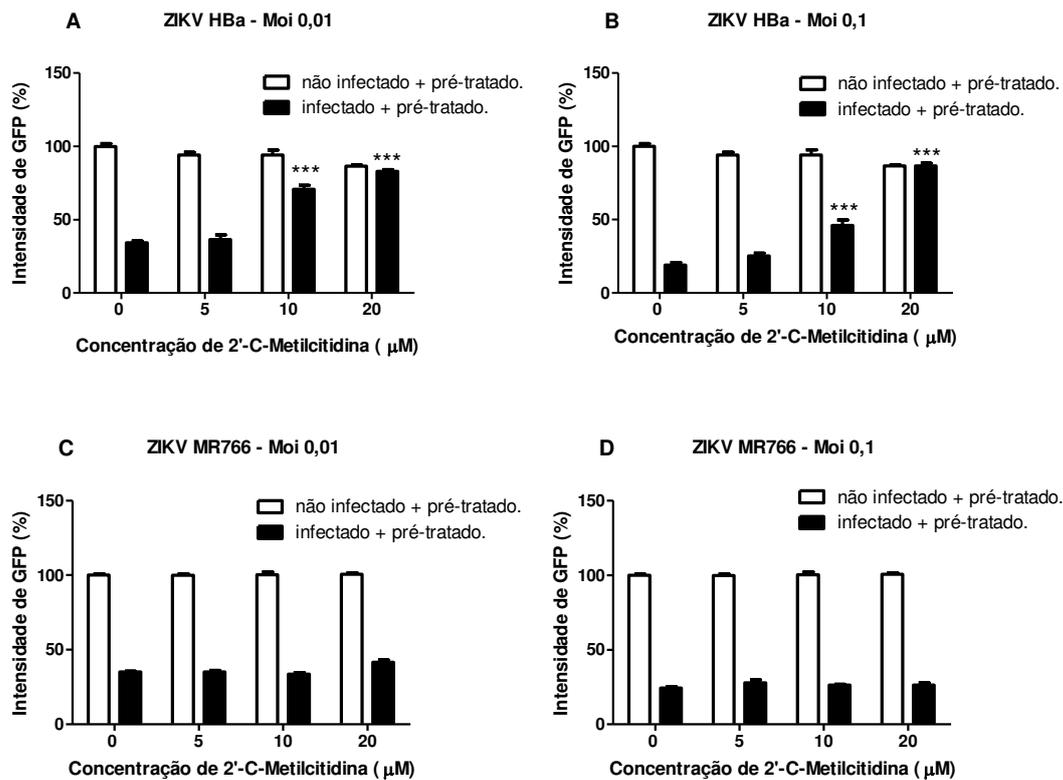


Figura 7- Ensaio de avaliação da atividade citoprotetora ou antiviral do fármaco 2'-C-Metilcitidina em células Vero-Fugw pool. Células Vero Fugw pool foram infectadas com as cepas de ZIKV HBA (A-B), ZIKV MR766 (C-D) utilizando MOI 0,01 e 0,1 com o objetivo de verificar potencial citoprotetor ou antiviral do composto nas concentrações de 5, 10 e 20 µM. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 72h para ZIKV HBA, ZIKV MR766, sendo realizada citometria de fluxo após os respectivos períodos de incubação. A medida da intensidade de GFP expressa em cada condição funciona como indicativo da viabilidade celular nesse modelo experimental. Os resultados foram normalizados em função do grupo controle onde as células não receberam tratamento e não foram infectadas com os vírus (coluna branca 0 µM). Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. *** P<0,0001 relativo ao grupo controle 0 (Coluna Preta) em que as células foram apenas infectadas e não tratadas. Gráficos representativos de 2 experimentos independentes.

4.4 Comparação da inibição viral indicada pelo repórter GFP e titulação de partículas virais produzidas por células tratadas.

Em nossos ensaios *in vitro* pudemos observar um efeito antiviral ou mesmo citoprotetor associado à utilização do PCPZ, Amodiaquina e 2'-C-Metilcitidina em células infectadas por ZIKV. O tratamento com esses compostos induziu um resgate na expressão do GFP das células tratadas. Nossa dúvida consistiu então em saber se estes fármacos candidatos também reduziram a produção de vírus nas células tratadas. Essa avaliação pode ser feita por meio de um protocolo de titulação *in vitro*, tradicionalmente realizado para verificar a eficiência inibitória de compostos antivirais (McAuley & Beasley, 2016).

Neste sentido, realizamos um ensaio de titulação para avaliar a carga viral dos sobrenadantes coletados ao final dos experimentos *in vitro* com as células Vero-Fugw pool que foram infectadas e tratadas com esses compostos e que os resultados foram descritos acima.

-Comparação de resultados de citometria para GFP e titulação viral utilizando o fármaco candidato Proclorperazina

É possível verificar através da titulação que houve uma diminuição da potência da infecção viral observada na figura 8 através da redução do tamanho e quantidade das placas de lise na condição de tratamento de 10 μ M com o composto Proclorperazina. Isto confirma o que havia sido observado nos gráficos de citometria de fluxo (Fig. 3 A-D) para ambas as linhagens de ZIKV indicando atividade antiviral de PCPZ contra ZIKV HBa e MR766. O grupo envolvendo infecção com ZIKV MR766 mostrou que apesar de não haver uma redução da quantidade de placas de lise verificadas na condição de 10 μ M, o fármaco PCPZ atuou modificando o fenótipo de expressão dessas placas, levando a geração de placas significativamente menores, um fator interessante que pode ou não ser correlacionado a uma possível diminuição da carga viral e que deve ser melhor estudado em um outro momento. Apesar da diminuição quantitativa do número de placas de lise nas amostras tratadas com 10 μ M de Proclorperazina foi possível verificar que o título viral apresentou alteração significativa apenas na condição de tratamento de 10 μ M para as células infectadas com o menor MOI de ZIKV HBa (Figura 8A), isso poderia estar correlacionado com as limitações da metodologia empregada onde a determinação da carga viral é direcionada apenas pela contabilização da quantidade de placas de lise sem se atentar para o tamanho dessas placas.

- Comparação de resultados de citometria para GFP e titulação viral utilizando o fármaco candidato Amodiaquina

As titulações envolvendo os sobrenadantes coletados das células infectadas e tratadas com o composto Amodiaquina mostrou que o fármaco consegue reduzir a carga viral nas concentrações de 10 e 20 μ M para a infecção com ZIKV HBa (Figura 9 A-B), confirmando os resultados do experimento por citometria de fluxo (Figuras 4A e 4B). Contudo o mesmo padrão de redução da carga viral não foi observado nos sobrenadantes coletados das células infectadas com a linhagem africana (Figura 9 C-D), neste grupo ao invés de diminuir a formação de placas de lise no tratamento de 10 μ M o composto pareceu favorecer a infecção, aumentando a quantidade de placas observadas. Já nos sobrenadantes tratados com 20 μ M a ausência total

de placas também torna a análise por essa metodologia questionável. Apesar de não podermos afirmar se o composto Amodiaquina apresenta propriedade antiviral contra ZIKV entende-se que nos ensaios de citometria de fluxo o tratamento com esse composto levou a uma diminuição significativa do efeito citopático para ambas as linhagens virais (Figuras 4 A-D) indicando que este composto apresenta propriedade citoprotetoras significativas. Com alvo de confirmar os resultados obtidos com nossa metodologia, iremos avaliar esses sobrenadantes em comparação à outra metodologia já bem estabelecida, através de um ensaio de citotoxicidade quantificando enzima LDH (Lactato desidrogenase).

- Comparação de resultados de citometria para GFP e titulação viral utilizando o fármaco candidato 2'-C-Metilcitidina

O composto 2'-C-Metilcitidina foi selecionado como nosso controle no experimento de citometria de fluxo por já haver estudo indicando seu potencial antiviral contra ZIKV (Zmurko et al., 2016). Apesar de em nossos resultados ele ter reduzido o efeito citopático nas células infectadas com o vírus que receberam tratamento de 10 e 20 μ M (Figura 7 A-B) os mesmos resultados não foram observados nas titulações de seus sobrenadantes, que podem ser verificados através das figuras 10A e 10B. Os ensaios de titulações dos sobrenadantes infectados e tratados com esse composto não apresentaram diferenças significativas com relação à redução da formação das placas de lise entre as amostras tratadas e não tratadas. Supomos que apesar deste composto não conseguir reduzir a carga viral de forma significativa ele poderia proteger essas mesmas células do efeito citopático decorrente da infecção viral, essa hipótese também será testada através de ensaios de citotoxicidade por quantificação de LDH.

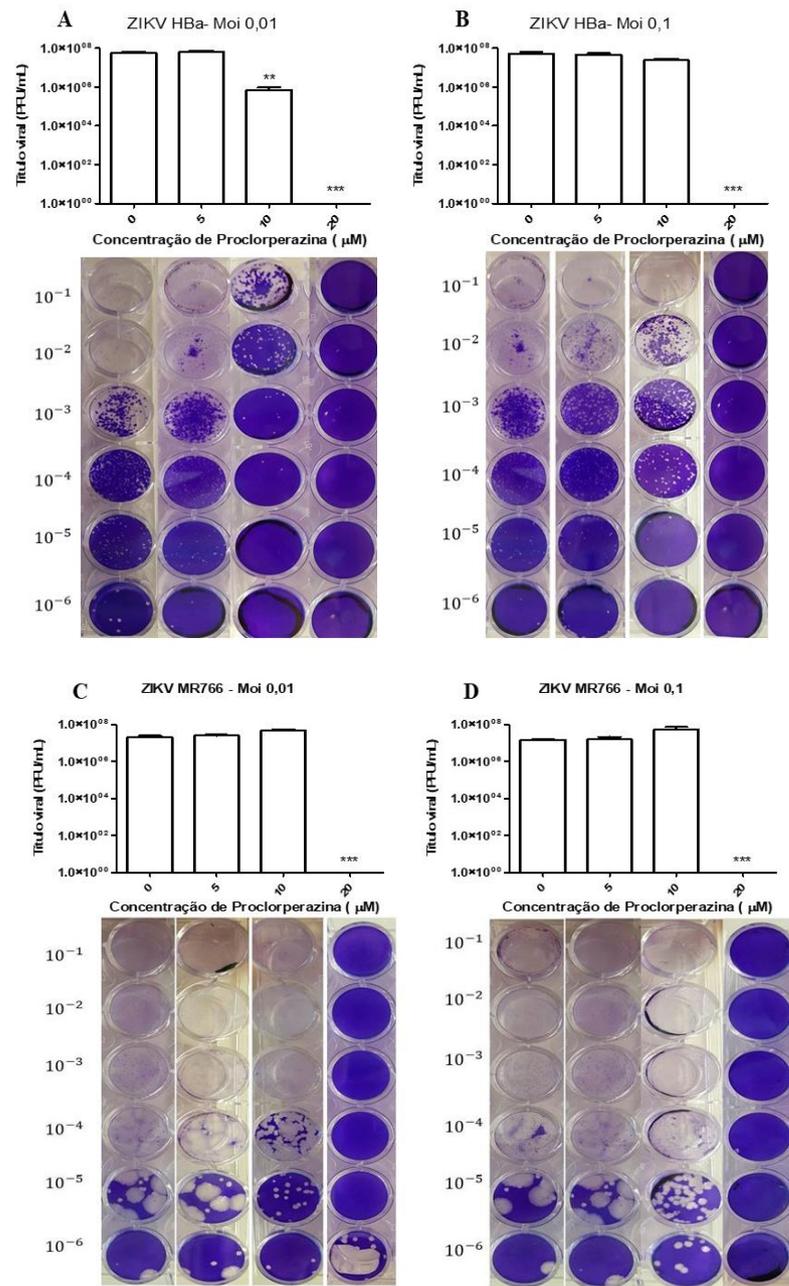


Figura 8– Ensaio de formação de placa demonstrou diminuição da carga viral dos sobrenadantes que receberam tratamento com Proclorperazina na concentração de 10 μM . Monocamada de células VERO foram incubadas com diluições seriadas dos sobrenadantes coletados em cada condição de tratamento com o fármaco PCPZ do experimento anterior por 2h, seguindo da retirada das amostras e adição de meio viscoso contendo carboximetilcelulose (CMC). Posteriormente o meio foi retirado sendo adicionado o corante Cristal violeta, as placas de lise foram contabilizadas e os títulos virais determinados. (A-B) Gráficos e figuras representativas das titulações dos sobrenadantes que foram desafiados a infecção com o vírus ZIKV HBA e tratamento com Proclorperazina utilizando-se os MOIs de 0,01 (A) e 0,1 (B). (C-D) Gráficos e figuras representativas das titulações dos sobrenadantes que foram desafiados a infecção com o vírus ZIKV MR766 e tratamento com Proclorperazina utilizando-se os MOIs de 0,01 (C) e 0,1 (D). Os resultados gráficos são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. ** e *** $P < 0,0001$ relativo ao grupo controle 0 μM . Imagens representativas de 3 experimentos independentes.

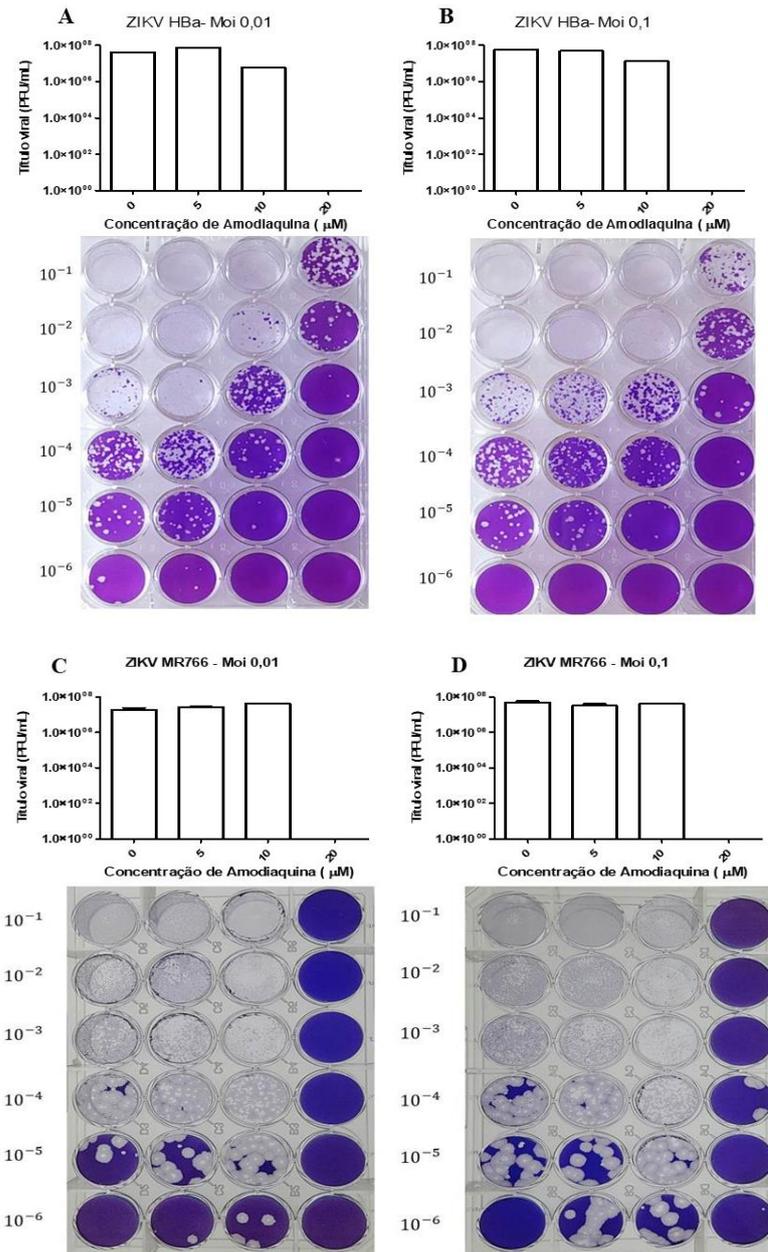


Figura 9 – Ensaio de formação de placa para avaliação do potencial antiviral do composto Amodiaquina.

Monocamada de células VERO foram incubadas com diluições seriadas dos sobrenadantes coletados em cada condição de tratamento com o fármaco Amodiaquina no experimento da metodologia por citometria de fluxo por 2h, seguindo da retirada das amostras e adição de meio viscoso contendo CMC. Posteriormente o meio foi retirado sendo adicionado o corante Cristal violeta, as placas de lise foram contabilizadas e os títulos virais determinados. (A-B) Gráficos e figuras representativas das titulações dos sobrenadantes que foram desafiados a infecção com o vírus ZIKV HbA e tratamento com Amodiaquina utilizando-se os MOIs de 0,01 (A) e 0,1 (B). (C-D) Gráficos e figuras representativas das titulações dos sobrenadantes que foram desafiados a infecção com o vírus ZIKV MR766 e tratamento com Amodiaquina utilizando-se os MOIs de 0,01 (C) e 0,1 (D). Os resultados gráficos são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. Imagens representativas de 1 experimento independente em 9A e 9B e 3 experimentos independentes em 9C e 9D.

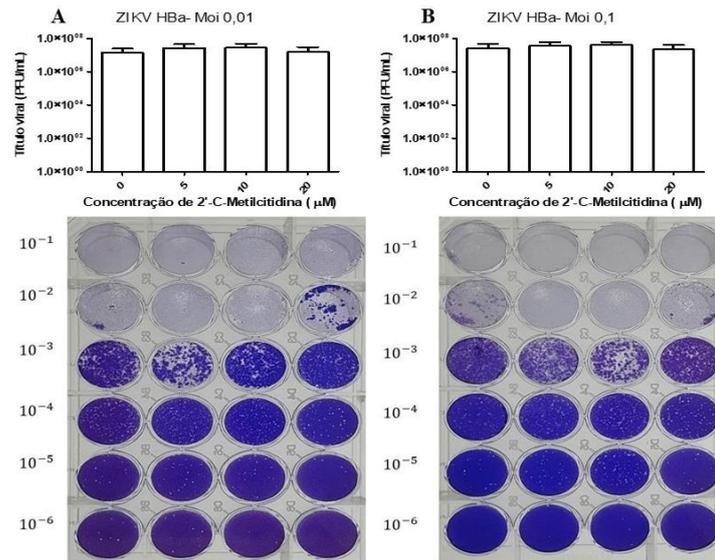


Figura 10 – Titulações dos sobrenadantes das células infectadas e tratadas com o composto 2'-C-Metilcitidina. Monocamada de células VERO foram incubadas com diluições seriadas dos sobrenadantes coletados em cada condição de tratamento com o composto 2'-Metilcitidina no experimento da metodologia de citometria de fluxo por 2h, seguindo da retirada das amostras e adição de meio viscoso contendo CMC. Posteriormente o meio foi retirado sendo adicionado o corante Cristal violeta, as placas de lise foram contabilizadas e os títulos virais determinados. (A-B). Gráficos e figuras representativas das titulações dos sobrenadantes que foram desafiados a infecção com o vírus ZIKV HBa e tratamento com 2'-Metilcitidina utilizando-se os MOIs de 0,01 (A) e 0,1 (B). Os resultados gráficos são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. Imagens representativas de 3 experimento independentes.

4.5 Comparação da diminuição do efeito citopático indicada pelo repórter GFP e quantificação da citotoxicidade gerada nas células tratadas.

Foi possível verificar através do nosso ensaio por citometria de fluxo que os compostos Proclorperazina, Amodiaquina e 2'-C-Metilcitidina ao serem utilizados como forma de tratamento em células infectadas com ZIKV conseguiram diminuir ou até inibir o efeito citopático característico desse tipo de infecção.

Os ensaios de titulação dos sobrenadantes das células infectadas e tratadas com esses compostos mostraram que apesar de conseguirmos verificar um decréscimo do efeito citopático nas células tratadas, em alguns casos, isso não parecia correlacionado diretamente a uma diminuição significativa da carga viral nessas condições.

Dessa forma com alvo de confirmar o potencial citoprotetor de cada composto analisado e confirmar os resultados obtidos do ensaio *in vitro* analisado por citometria de fluxo optamos por realizar um ensaio de avaliação de citotoxicidade celular através da medida de LDH. Nesse ensaio procuramos quantificar o nível da enzima LDH em todos os sobrenadantes que foram coletados no ensaio de citometria de fluxo e analisados no ensaio de formação de

placa. Como a LDH é uma enzima liberada pela célula em condições de sofrimento, no caso de citoproteção, esperávamos observar resultados semelhantes às indicações de GFP.

As figuras 11 e 12 demonstram os resultados parciais de avaliação da citotoxicidade por LDH. A fim de se testar se conseguiríamos detectar citotoxicidade usando a metodologia de medida por LDH nos sobrenadantes coletados na etapa final dos experimentos *in vitro* que eram direcionados à análise por citometria de fluxo realizamos um ensaio teste.

Em uma primeira etapa deste ensaio fizemos uma curva de morte usando a metodologia descrita em teste de efeito citopático utilizando a linhagem de células Vero-Fugw pool. Os sobrenadantes de cada MOI dessa curva foram coletados ao final do período de incubação e utilizados para uma segunda etapa onde eles foram submetidos à metodologia de análise de citotoxicidade por medida de LDH. O gráfico da curva de morte analisada por citometria pode ser visualizado na figura 11A e a análise dos sobrenadantes coletados dessa curva de morte que foram submetidos ao teste de LDH pode ser verificado na figura 11B. Esses resultados mostraram que a metodologia de LDH poderia ser utilizada como uma medida de comparação para avaliar citoproteção das células que foram infectadas com o vírus e tratadas com os compostos. Assim como na curva de morte, pode ser visualizado na figura 11B uma relação dose-resposta, onde à medida que se aumenta a carga viral há um aumento da porcentagem citotóxica dos sobrenadantes analisados.

Com intuito de realizarmos os testes com os sobrenadantes analisados nos ensaios de titulação selecionamos todos os pontos dos dois grupos analisados (não infectados + pré-tratados e infectados + pré-tratados) para os sobrenadantes coletados das células infectadas com ZIKV HBa e ZIKV MR766, usando-se MOI de 0,01 para os compostos Proclorperazina, Amodiaquina e 2'-C-Metilcitidina. Foi possível verificar que o composto Proclorperazina inibiu o efeito citopático característico da infecção viral na concentração de 10 μ M, tanto ao analisarmos as infecções com ZIKV HBa (Figura 12A) quanto com ZIKV MR766 (Figura 12B). O decréscimo da viabilidade celular verificado na condição de 20 μ M confirma o efeito citotóxico deste composto nesta concentração para ZIKV HBa (Figura 12A). O aumento da viabilidade celular na condição de tratamento de 20 μ M para ZIKV MR766 indica uma limitação do ensaio utilizado, visto que as células analisadas nessa condição provavelmente tiveram uma morte rápida em um período de aproximadamente 24h após infecção viral, como a enzima LDH apresenta um tempo de meia-vida baixo, ao realizarmos a coleta do sobrenadante em 72h pós-infecção não foi possível detectar uma quantidade coerente de LDH viável. (Figura 12B).

Ao analisarmos os sobrenadantes coletados referente ao tratamento com o composto Amodiaquina verificamos através do ensaio de LDH que ele conseguiu inibir o efeito citopático associado à infecção viral nos sobrenadantes das amostras tratadas com 10 e 20 μM quando comparado com os sobrenadantes que não foram tratados com o respectivo composto (0 μM) (Figura 12C-D). Da mesma forma o composto 2'-C-Metilcitidina também conseguiu inibir o efeito citopático nos sobrenadantes submetidos ao tratamento de 20 μM quando comparado com os sobrenadantes que não foram tratados com o respectivo composto (0 μM) (Figura 12E). Esses resultados demonstraram que é possível confirmar o potencial citoprotetor verificado nos ensaios de citometria de fluxo para todos os compostos analisados e demonstra a viabilidade de utilização de nosso bioensaio para avaliação de compostos com essa característica terapêutica.

Uma observação interessante foi que ao analisarmos os resultados obtidos pela metodologia de LDH dos sobrenadantes relativos ao grupo controle, que foi apenas pré-tratado com os compostos, verificamos a ausência total de sinais colorimétricos em todos os pontos analisados, não conseguindo identificar a citotoxicidade relativa dos compostos às células observados anteriormente nos experimentos de citometria de fluxo. Acreditamos que isso ocorra devido às limitações experimentais da metodologia por LDH em que a enzima apresenta um tempo de meia-vida no sobrenadante relativamente curto. Como os casos de efeito citotóxico verificado pelos compostos ocorrerem nas primeiras 24h de análise experimental, após o período de 72h de incubação a enzima liberada na etapa inicial do experimento não estaria mais na sua forma ativa.

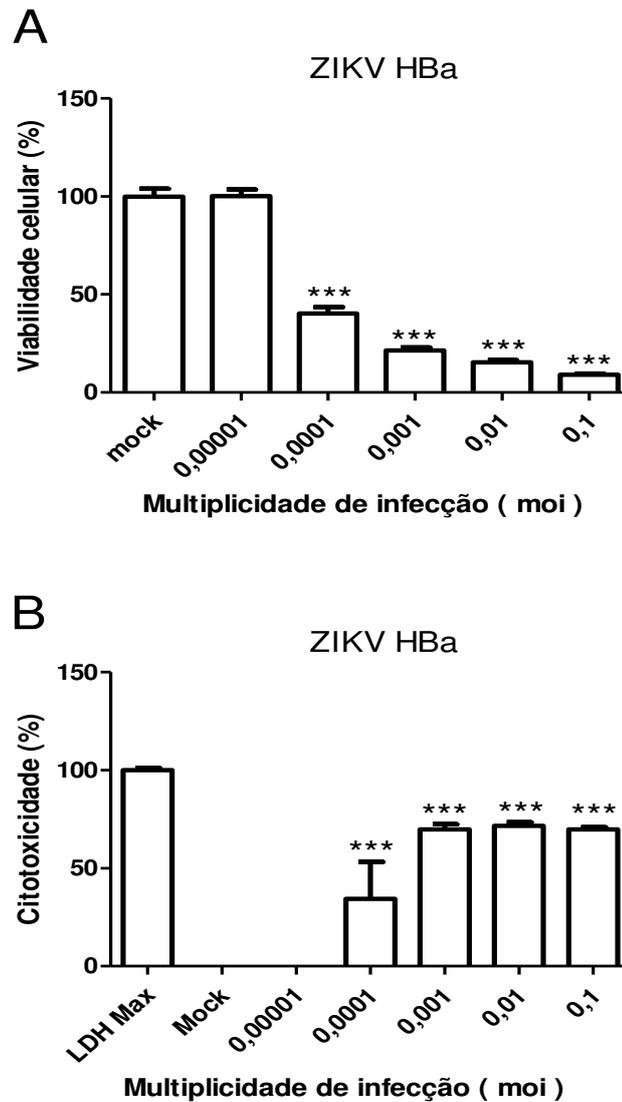


Figura 11- Ensaio de citotoxicidade medido por LDH de células infectadas com ZIKV. (A) Células Vero-Fugw pool foram infectadas com ZIKV HBa utilizando-se diferentes MOIs a fim de ser simulado uma interação dose – resposta relacionada ao aumento da carga viral. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 72h, sendo realizada coleta dos sobrenadantes para o ensaio de LDH seguido por citometria de fluxo para GFP após o período de incubação. A viabilidade celular foi determinada medindo-se a intensidade de GFP expressa em cada condição com as células não infectadas. (B). Os sobrenadantes coletados no experimento de curva de morte foram analisados quanto sua citotoxicidade através da quantificação de LDH que foi liberado no meio extracelular. As amostras foram incubadas com o kit de reação Pierce-LDH por 30 minutos e submetidas a análise de absorbância no leitor de placa. A citotoxicidade é medida em função da quantidade de enzima LDH que foi liberada no meio extracelular por danos a membrana plasmática e que reagiu com compostos do kit de detecção gerando um sinal de absorbância. Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. *** P<0,0001 e ** P< 0,001 relativos ao grupo controle Mock. Gráficos representativos de 1 experimento. Mock= células não infectadas, LDH Max = sobrenadantes de células submetidas à lise com expressão máxima de LDH.

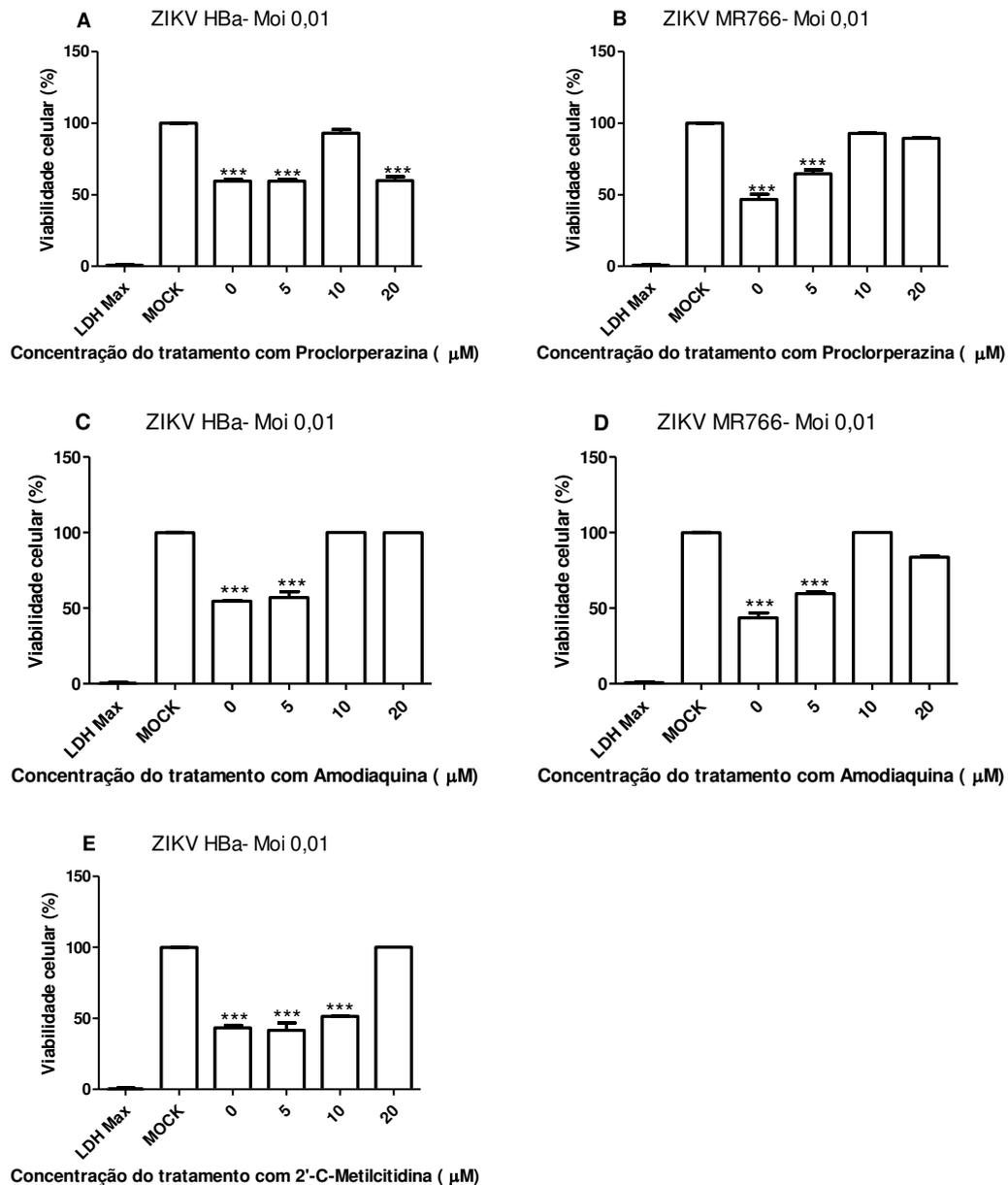


Figura 12- Ensaio de citotoxicidade medido por LDH de células infectadas com ZIKV e tratadas com compostos químicos. (A-B) Os sobrenadantes coletados no experimento de citometria 3A e 3C foram analisados quanto sua citotoxicidade através da quantificação de LDH que foi liberado no meio extracelular para células tratadas com composto Proclorperazina. (C-D) Sobrenadantes coletados no experimento de citometria 4A e 4C foram analisados quanto sua citotoxicidade através da quantificação de LDH que foi liberado no meio extracelular para células tratadas com composto Amodiaquina. (E) Sobrenadantes coletados no experimento de citometria 7A foram analisados quanto sua citotoxicidade através da quantificação de LDH que foi liberado no meio extracelular para células tratadas com composto 2'-C-Metilcetidina. Amostras foram incubadas com o kit de reação Pierce-LDH por 30 minutos e submetidas a análise de absorvância no leitor de placa. A viabilidade celular é medida em função da quantidade de enzima LDH que foi liberada no meio extracelular por danos a membrana plasmática e que reagiu com compostos do kit de detecção gerando um sinal de absorvância. Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. *** $P < 0,0001$ e ** $P < 0,001$ relativos ao grupo controle Mock. Gráficos representativos de 1 experimento. Mock= células não infectadas, LDH Max = sobrenadantes de células submetidas à lise com expressão máxima de LDH.

4.6 Screening de biblioteca de compostos para avaliar atividade antiviral e/ou citoprotetora ao vírus da Zika.

A partir dos resultados alcançados nas etapas anteriores, iniciamos os testes para uso de nosso bioensaio em um modelo de avaliação em larga escala de *screening* de bibliotecas de compostos. Iniciamos essa etapa experimental utilizando uma biblioteca de 76 compostos que foram sintetizados pela Dra. Silvana Rocco, pesquisadora do LNBio, e que possuíam aplicações terapêuticas diversas. Os compostos Proclorperazina e Amodiaquina foram utilizados como controles positivos visto os bons resultados alcançados utilizando tratamento de 10 μ M nas etapas experimentais relatadas anteriormente.

O ensaio seguiu os padrões estabelecidos nos ensaios de efeito citopático e testes *in vitro* utilizando tempo de incubação de 72 horas e MOI de 0,01. Priorizamos por realizar o ensaio apenas com a cepa de ZIKV HBa entendendo que está é a cepa com maior interesse terapêutico, visto ser a principal linhagem relacionada com a ocorrência de casos de malformações congênitas. Utilizamos a condição de tratamento de 10 μ M por ter sido esta concentração que apresentou os melhores resultados na etapa de análise dos compostos nos ensaios *in vitro*. Todas as condições foram analisadas utilizando-se triplicatas e para cada concentração testada do fármaco realizou-se controles a fim de se verificar efeitos citotóxicos do fármaco às células.

Os resultados verificados através da figura 13 mostram que apenas os controles positivos relativos ao tratamento com os compostos Proclorperazina e Amodiaquina conseguiram recuperar a expressão de GFP das células infectadas, representados pelos dois últimos compostos dos gráficos. Apenas o composto Proclorperazina apresentou uma recuperação do sinal de GFP significativa confirmando seu potencial citoprotetor/antiviral ao vírus da Zika. A não reprodutibilidade de recuperação do sinal de GFP de forma significativa pelo composto Amodiaquina poderia estar relacionada as variações experimentais realizadas e novos estudos devem ser efetuados para este composto neste novo modelo experimental. Os resultados apresentados mostram a viabilidade de utilizarmos nosso modelo de bioensaio para a realização de *screening* de compostos em larga escala que apresentem atividade citoprotetora e/ou antiviral.

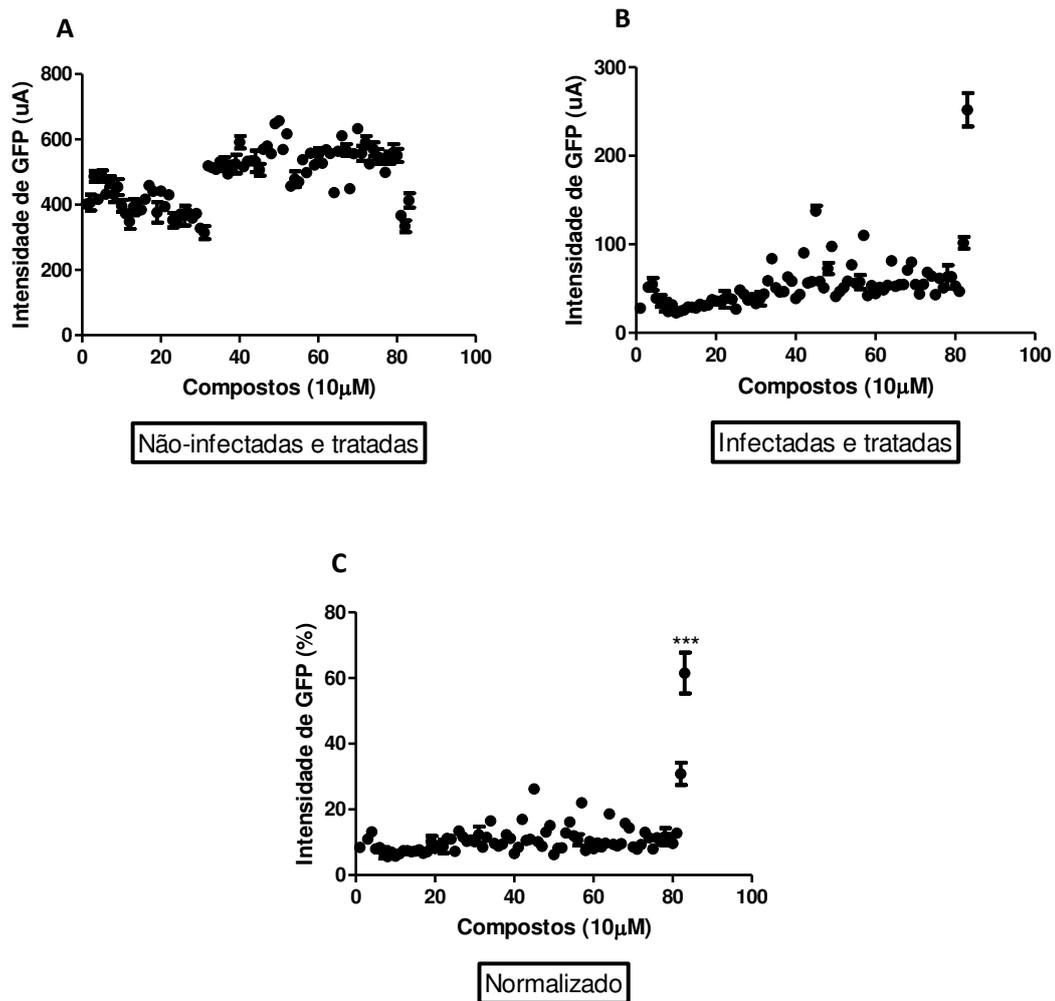


Figura 13. Ensaio de screening de biblioteca de compostos para avaliação de potencial citoprotetor e/ou antiviral ao vírus da Zika utilizando células geneticamente modificadas e a ferramenta de citometria de fluxo. Células Vero Fugw pool foram infectadas com a cepas de ZIKV HBa utilizando MOI 0,01 com o objetivo de verificar potencial citoprotetor ou antiviral dos 76 compostos químicos utilizando a concentração de tratamento de 10 μ M. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 72h para ZIKV HBa, sendo realizada citometria de fluxo após o respectivo período de incubação. A medida da intensidade de GFP expressa em cada condição funciona como indicativo da viabilidade celular nesse modelo experimental. Os resultados são expressos em média aritmética +/- erro padrão da média. *** $P < 0,05$ relativo ao grupo controle contendo as amostras infectadas que não foram tratadas (amostra 1 do gráfico). Os resultados foram normalizados ao dividirmos os valores observados no gráfico B pelos valores respectivos de cada composto com os resultados observados em A. Gráficos representativos de 1 experimento independente realizado em triplicatas para cada amostra avaliada.

5. DISCUSSÃO

O *zika vírus* foi identificado como um importante agente causador de doenças neurológicas graves. Houveram surtos epidêmicos registrados mundialmente, sendo que no Brasil este surto foi correlacionado com um aumento significativo nos casos de microcefalia e síndromes neurológicas graves, colocando milhares de pessoas em estado de risco. Apesar de haver um esforço internacional no entendimento da patologia associada ao ZIKV, ainda não existe vacinas nem tratamentos aprovados para uso em humanos.

Segundo dados da OMS o número de infecções pelo vírus da Zika diminuiu significativamente no ano 2017 ((WHO) World Health Organization, 2017), contudo seu estudo ainda é extremamente importante visto que surtos infecciosos envolvendo espécies de flavivirus estão sempre surgindo ou reemergindo, muitas vezes levando ao desenvolvimento de doenças mais complexas que as anteriormente observadas. Por se tratar de um vírus cujo genoma é de RNA, o vírus circulante é susceptível a sofrer mutações que podem resultar na seleção de cepas mais agressivas, ou resistentes ao tratamento farmacológico ou vacinas. É interessante observar, que se compararmos a cepa de ZIKV africana, com cepas de ZIKV isoladas no Brasil, temos uma identidade genômica em torno de 90% ((Calvet et al., 2016) – alinhamento cepa HBA x MR766: anexo II), entretanto a cepa brasileira foi associada com a indução de microcefalia, enquanto não existem relatos desse quadro associados à infecção pelo ZIKV africano.

As vacinas possibilitam um significativo controle de doenças transmitidas por vírus (Andre, Booy, Bock, Clemens, & Datta, 2014; Morrison & Plotkin, 2016), contudo, em virtude de sua complexidade de manufatura e ensaios clínicos, são necessários vários anos até se tornarem acessíveis à população (Plotkin, Robinson, Cunningham, Iqbal, & Larsen, 2017; Smith, Lipsitch, & Almond, 2011). Nessa janela de tempo em que não existe uma vacina ou se desconhecem medidas preventivas podem ocorrer os grandes surtos infecciosos, além disso, a vacina profilática em si não garante uma forma de tratamento dos pacientes que estão enfrentando um processo infeccioso, ficando estes vulneráveis a todos os possíveis danos causados pela infecção viral. Os estudos de novos compostos com possível ação terapêutica contra os vírus, também precisam superar, assim como as vacinas, vários aspectos operacionais e experimentais até poderem ser manufaturados em larga escala e disponibilizados para uso clínico (Ciociola et al., 2014). Tendo isso em vista, pesquisadores tem buscado realizar a análise de compostos já aprovados por agências regulatórias e reposicioná-los para o tratamento de doenças diferentes das quais eles foram desenvolvidos inicialmente (Cheng et al., 2016; Ekins et al., 2016).

Com alvo de facilitar ou até mesmo criar um método alternativo para análise desses compostos, propomos em nossa estratégia fazer uso da citometria de fluxo, uma ferramenta bastante utilizada em laboratórios de biologia celular, para avaliar o possível potencial antiviral ou citoprotetor de compostos químicos contra o ZIKV. Essa metodologia também apresenta um baixo custo, se comparada a outras metodologias que podem utilizar anticorpos monoclonais, compostos radioativos ou reações colorimétricas com substratos comerciais (Pankaj, 2013).

A metodologia de citometria de fluxo foi à selecionada para realização do ensaio entendendo-se que ela é a melhor forma de se mensurar quantitativamente a intensidade de expressão de GFP das células. Outras metodologias que utilizam ferramentas de microscopia confocal ou análise através do sistema *Operetta* exigem uma etapa de marcação nucleica com corante DAPI ou Hoechst que acabam por mascarar a quantificação do GFP citoplasmático e por isso foram descartadas. Além disso, a ferramenta de citometria de fluxo consegue mensurar alterações no padrão de expressão de GFP das células não apenas em etapas finais onde há morte celular, mas também em etapas intermediárias de estresse celular.

Em nosso método células VERO foram modificadas geneticamente para passar a expressar a proteína repórter GFP citoplasmática. Metodologias envolvendo adição de genes repórteres são bem estabelecidas e almejadas, para o próprio ZIKV já existe a tecnologia descrita que modifica o genoma do vírus adicionando o repórter GFP para facilitar a quantificação viral (Gadea et al., 2016). Contudo a dificuldade aparente de efetuar modificações genéticas no genoma de flavivírus, além da consideração de alterar de forma indesejável propriedades do vírus parental, nos levou a pensar em uma metodologia alternativa que consiste no estabelecimento de uma célula permissiva repórter, indicadora da infecção viral. Ao trabalharmos com essas células modificadas, não só evitaríamos a complexidade do processo de clonagem de flavivírus recombinante, como também teríamos a vantagem de trabalhar com a partícula viral original, sem alterar sua virulência.

Estudos recentes demonstraram que o ZIKV apresenta tropismo para diferentes tipos celulares, tais como células progenitoras neurais, células neurais maduras e astrócitos, além de células placentárias e do trato do sistema reprodutivo (Ferreira de Lima Neto et al., 2017; Miner & Diamond, 2017; Xavier-Neto et al., 2017). Contudo, optamos por utilizar as células VERO em nossos experimentos por esta ser uma linhagem fácil de trabalhar em cultura, que é bastante utilizada em experimentos envolvendo flavivírus, e que demonstrou ser susceptível ao vírus da Zika (Deng et al., 2016; Ekins et al., 2016; Yin et al., 2009). Além disso, ela é uma linhagem que poderia ser utilizada tanto nos experimentos de citometria de fluxo,

quanto nos experimentos de titulação por ensaio de formação de placa, garantindo-nos assim uma boa abordagem inicial sob o ponto de vista da padronização de nossa metodologia.

Pudemos demonstrar através dos resultados expostos nesse trabalho que esta metodologia conseguiu ser utilizada para efetuar análises eficientes dos compostos em um tempo reduzido, variando entre quatro e cinco dias, quando comparado com processos bem estabelecidos como é o caso das titulações por ensaio de formação de placa que demoram cerca de sete dias. Da mesma forma, também conseguimos reduzir o custo dos ensaios de avaliação dos compostos quando comparamos os gastos utilizando-se nossa metodologia com ensaios de citotoxicidade bastante utilizados como o de LDH.

Além disso, usando nosso modelo experimental conseguimos mensurar a atividade citoprotetora de compostos que conseguem impedir o dano do vírus às células mesmo que essa proteção não esteja diretamente relacionada com a diminuição significativa da carga viral, como foi o caso dos compostos Amodiaquina e 2'-C-Metilcitidina. Esse é um fato bastante interessante ao olharmos sob a perspectiva de infecção por ZIKV, visto que os pacientes infectados geralmente só procuram auxílio médico na fase sintomática da doença que é caracterizada por ser a fase onde a taxa viral já está em queda, assim é mais interessante oferecer um tratamento que proteja as células do paciente do que aquele que elimine o vírus do organismo deste. Da mesma forma, ao pensarmos no principal grupo de risco, que são mulheres em período gestacional, um tratamento dentro de uma janela de tempo maior com compostos citoprotetores irão garantir proteção das células do sistema nervoso central em desenvolvimento do feto, podendo impedir a ocorrência dos casos de doenças congênitas neurológicas como a microcefalia.

Sendo assim, o estudo de compostos citoprotetores amplia o número de fármacos que podem ser direcionados a população como medida terapêutica. Apesar de ser muito bem estudado e muito utilizado para descoberta de compostos com atividade antiviral, ensaios de formação de placa acabam por não conseguir detectar esses compostos, sendo uma boa alternativa utilizar nosso modelo experimental.

Outra vantagem experimental é que nosso sistema é facilmente adaptável para análise envolvendo outros vírus que apresentem efeito citopático, e para outras células as quais seja interessante se analisarem. Assim, apesar dele ter sido proposto para ampliar o conhecimento e buscar alternativas terapêuticas específicas contra o ZIKV, essa metodologia também poderá ser utilizada para *screening* farmacológico de candidatos dirigidos a inibição de outros vírus citopáticos.

Uma parte do nosso trabalho consistiu em avaliar fármacos já aprovados por agências regulatórias seguindo a proposta de reposição de mercado. Os fármacos Proclorperazina, Amodiaquina, Quinacrina e Berberina atendiam essa premissa e já haviam sido descritos na literatura por apresentarem atividade antiviral contra outras espécies de *arbovírus*, dessa forma decidimos analisa-los quanto seu possível potencial citoprotetor ou antiviral contra as cepas de ZIKV Brasileira (HBa) e Africana (MR766) (Balasubramanian et al., 2016; Simanjuntak et al., 2015; Varghese et al., 2016). Esses fármacos também já haviam sido descritos em um estudo de bioinformática por apresentarem potencial de interação com a proteína NS3 de linhagens de ZIKV (Sahoo et al., 2016).

O composto Proclorperazina é descrito na literatura por ser um antagonista do receptor de dopamina (D2R) comumente utilizado no tratamento de dores de cabeça, náuseas e vômitos que demonstrou apresentar capacidade antiviral contra linhagens virais de Dengue (Simanjuntak et al., 2015). Em virtude da similaridade genômica entre o vírus da Zika e o vírus da Dengue optamos por testar esse potencial seguindo nossa metodologia. Os resultados envolvendo as cepas de ZIKV confirmaram o potencial antiviral/citoprotetor desse composto, onde seu uso conseguiu proteger significativamente a morte celular das células tratadas e infectadas. Também conseguimos visualizar a diminuição da carga viral para a linhagem brasileira e uma interessante mudança de fenótipo do vírus com relação à carga viral nas células infectadas com a linhagem africana. Esses dados confirmaram nossas hipóteses e apesar do composto ter mostrado uma atividade eficiente apenas usando-se uma concentração de 10 μM , estudos futuros ainda podem ser feitos para aprimorar a farmacocinética e atividade da molécula. O tratamento com esse tipo de composto seria interessante visto que ele consegue amenizar sintomas característicos de mulheres grávidas como náuseas e vômitos e dessa forma poderia garantir proteção profilática às células neuronais do feto em desenvolvimento na eminência de uma infecção em zonas endêmicas.

Apesar de o composto Proclorperazina ter sido descrito inicialmente com relação a sua atividade antiviral contra dengue vírus, não conseguimos reproduzir esses mesmos resultados utilizando nossa cepa viral de DENV-2. Entendendo-se que o ensaio foi realizado utilizando uma linhagem celular diferente daquela abordada nos experimentos com o dengue vírus, podemos supor que a ineficiência observada nesses resultados poderia estar relacionada a esse fato. Os estudos mostraram que a atividade antiviral da Proclorperazina contra dengue estaria relacionada a mecanismos de inibição de entrada do vírus na célula via interação com o receptor dopamina D2R, que é característico de células neuronais, células imunes e sanguíneas (Simanjuntak et al., 2015). Contudo não há relatos se esse receptor estaria presente nas células

VERO ou não, e caso não seja um receptor característico dessas células isso também justificaria o porquê da não reprodutibilidade dos resultados usando a linhagem de DENV em nossos ensaios. Como estamos trabalhando com linhagens virais que apresentam similaridades entre si, mas são geneticamente diferentes entendemos que o tratamento com Proclorperazina poderia ter um potencial antiviral contra ZIKV por uma via diferente da descrita de entrada do vírus na célula por mecanismos dependentes de clatrina e por isso conseguimos visualizar os resultados positivos para ZIKV usando seu tratamento. Estudos posteriores poderão investigar melhor qual o mecanismo que o composto utiliza para garantir proteção às células infectadas.

Através de nossos resultados também conseguimos avaliar o potencial antiviral do composto Amodiaquina para inibir ZIKV. Esse fármaco é descrito na literatura por ter ação antimalárica, sendo utilizado como um substituto ou método alternativo para tratamentos com o composto Cloroquina. A Amodiaquina foi descrita na literatura por apresentar ação antiviral contra linhagens de dengue vírus e por apresentar similaridades estruturais com o composto Cloroquina, composto esse já descrito por apresentar atividade antiviral contra ZIKV (Balasubramanian et al., 2016; Delvecchio et al., 2016). Além disso, estudos *in silico* haviam demonstrado o possível potencial inibitório para o ZIKV desse composto (Sahoo et al., 2016) e, dessa forma, optamos por seu uso entendendo-se que ele poderia ser um ótimo candidato de análise. Os resultados mostraram que assim como o composto Cloriquina o fármaco Amodiaquina apresentou bons resultados, garantindo a proteção às células infectadas com ZIKV em quase 90% nas concentrações de 10 e 20 μM . Da mesma forma, também foi possível visualizar uma diminuição do número de placas de lise para as células infectadas com a linhagem HBa. O mesmo não foi alcançado para a linhagem MR766.

Os estudos já descritos na literatura envolvendo a atividade antiviral deste fármaco mostram que ele apresenta uma reação inibitória inespecífica não interagindo e bloqueando a funcionalidade de nenhuma proteína/enzima específica do vírus, mas sim supostamente interagindo em um mecanismo dependente da célula hospedeira importante para a infecção viral (Balasubramanian et al., 2016). Dessa forma entendendo-se que infecções com a linhagem MR766 possuem um padrão de infectividade e agressividade mais forte, necessitando-se de um MOI menor para obter mesmo efeito citopático comparável ao HBa (Figuras 4 e 9), a falta de especificidade na interação entre o composto e os mecanismos das células hospedeira poderiam não conseguir por si só diminuir a carga viral, mas igualmente conseguiriam garantir citoproteção impedindo a morte dessas células pelo vírus. Novos estudos devem ser conduzidos a fim de se verificar essa suposição.

Outro fármaco antimalárico analisado por nosso experimento foi o composto Quinacrina. Caracterizado por ser um composto inibidor de fosfolipase A2 seu uso é atualmente aplicado em diversas áreas incluindo no tratamento contra helmintos e de giardíase. Recentemente, foi descrito por apresentar atividade antiviral contra DENV e ZIKV, contudo não conseguimos reproduzir os mesmos resultados através do nosso modelo experimental (Balasubramanian, Teramoto, Kulkarni, Bhattacharjee, & Padmanabhan, 2017). O composto Quinacrina possui propriedades fluorescentes na mesma faixa do GFP que utilizamos para nossos experimentos e isso dificultou sua análise através de nossa metodologia ao ele ser adsorvido pelas células, além disso, ele mostrou uma citotoxicidade bastante elevada em nossos experimentos não sendo a melhor indicação como medida terapêutica para o ZIKV.

O último fármaco analisado por nossa metodologia, já aprovado pelas agências regulatórias para outro propósito terapêutico, foi o composto Berberina. Esse composto é um alcaloide usado no tratamento de infecções fúngicas e parasíticas, recentemente descrito por apresentar atividade antiviral contra espécies de Chikungunya (Varghese et al., 2016). Ele foi apresentado em um estudo de bioinformática com um alto potencial de ligação a proteína NS3 de cepas de ZIKV (Sahoo et al., 2016). Nossos resultados mostraram que apesar dele ter sido o que apresentou maior energia de ligação no estudo de bioinformática, não foi capaz de proteger nem inibir a replicação viral do vírus zika nas análises *in vitro*. Como há uma relativa ausência de testes *in vitro* envolvendo sua análise com espécies de flavivírus não temos um modelo informativo para contrapor os nossos resultados. Estudos de bioinformática possuem um potencial excelente para nos direcionar com relação a possíveis candidatos no tratamento com compostos antivirais, contudo os resultados acima demonstram a importância de se confirmar esses estudos através de metodologias *in vitro*.

O composto 2'-C-Metilcitidina, é um análogo de nucleosídeo desenvolvido como inibidor derivado de citosina que apresentou potencial antiviral contra espécies de flavivírus. Dentre as espécies relatadas se encontram o vírus da dengue (Lee et al., 2015), e ZIKV (Zmurko et al., 2016). Por já ter sua capacidade antiviral avaliada para ZIKV esse composto foi selecionado para ser nosso controle positivo e testar nossa metodologia. Nossos resultados mostraram que o composto apresenta potencial citoprotetor em células infectadas com ZIKV HBa, contudo, nos ensaios de titulação, não observamos uma diminuição da carga viral. Para as infecções com a linhagem MR766 não conseguimos verificar nenhuma atividade citoprotetora nem antiviral contrariando os dados da literatura. Novos ensaios devem ser realizados para confirmar os resultados obtidos.

A maioria dos compostos foi avaliada usando-se uma faixa de concentrações de 0 a 20 μM , em cultura de células, por ser esta a faixa de concentração em que esses compostos já haviam apresentado atividade antiviral contra outras espécies virais, em ensaios *in vitro*, descritos na literatura. Estudos de aprimoramento químico da molécula, com base em cristalografia, juntamente com estudos de bioinformática podem ser realizados visando diminuir a toxicidade do composto assim como aumentar a afinidade de interação com o vírus, ou mesmo com alvo de adequar parâmetros farmacocinéticos (Blundell et al., 2006; Hughes et al., 2011). É importante lembrar que análises *in vitro* são ótimas ferramentas para uma avaliação inicial, contudo no contexto de busca por novos fármacos com potencial terapêutico, estratégias *in vivo* sempre devem ser realizadas.

A última parte de nosso trabalho consistiu em iniciarmos os testes de aplicação de nosso bioensaio para realização de *screenings* de bibliotecas de compostos químicos que teriam ação terapêutica antiviral e/ou citoprotetora. Por ser uma etapa de padronização do sistema de análise de nosso bioensaio em larga escala, optamos por iniciarmos os testes utilizando uma biblioteca de compostos pequena (76 compostos) que se encontrava de forma acessível ao nosso grupo de pesquisas e que já havia sido avaliada para outras funcionalidades terapêuticas que não estavam relacionadas a ação antiviral ou citoprotetora ao vírus da Zika.

Os resultados obtidos através de nossos experimentos mostraram que apenas os compostos químicos utilizados como controles (Amodiaquina e Proclorperazina) apresentaram resgate do sinal de intensidade de GFP das células infectadas que receberam tratamento de 10 μM . Estudos envolvendo *screening* de compostos para descoberta de novas drogas com funcionalidade terapêutica avaliam centenas de compostos para encontrarem um único hit com a funcionalidade almejada (Barrows et al., 2016; Zhou et al., 2017), sendo assim, entendendo-se que utilizamos uma biblioteca relativamente pequena em número, é compreensível a não descoberta de compostos com ação citoprotetora ou antiviral ao vírus da Zika.

Não obstante a não descoberta de novos candidatos farmacológicos inovadores através da biblioteca analisada, o estudo inicial de *screening* de compostos provou que nosso bioensaio apresentou reprodutibilidade e aplicabilidade para ser utilizado como uma ferramenta importante no estudo de compostos com funcionalidade tanto antiviral quanto citoprotetora em modelos em larga escala, auxiliando tanto na busca de novos *hits*, quanto na realização de caracterizações secundárias mais complexas, em busca de *leads*, posteriormente utilizados para a geração de NCEs (novas entidades químicas) de uso terapêutico

De acordo com as observações pontuadas acima, entendemos que nosso bioensaio utilizando células geneticamente modificadas apresentou resultados consistentes e reprodutíveis demonstrando sua aplicabilidade como ferramenta para verificação do efeito terapêutico de compostos candidatos em pesquisas envolvendo o ZIKV ou outros vírus com capacidade citopática. Aprimoramentos posteriores da metodologia irão possibilitar que esse modelo seja utilizado em *screenings* de bibliotecas maiores, ampliando a busca de descoberta de compostos químicos inovadores para o vírus da Zika. Adicionalmente, também planejamos avaliar o efeito terapêutico de combinações de compostos, com alvo de reduzir dosagens e buscar potencializações sinérgicas que beneficiem a terapêutica.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, apresentamos resultados de um estudo realizado para desenvolver uma nova estratégia de avaliação de compostos candidatos, com alvo de inibir a infecção viral de ZIKV, ou mesmo de outros vírus que apresentam efeito citopático. Essa estratégia, baseada na utilização de um bioensaio apresenta consistência, reprodutibilidade e alta sensibilidade, e possibilita avaliar compostos químicos quanto a sua capacidade antiviral ou citoprotetora utilizando a análise por citometria de fluxo de células geneticamente modificadas. Além disso, o ensaio também possibilita obter uma análise preliminar da citotoxicidade dos compostos avaliados. A metodologia mostrou-se eficiente para avaliar compostos com ação citoprotetora que não estão diretamente relacionados com a diminuição da carga viral e que podem não ser perceptíveis usando-se métodos de titulação, sendo uma ferramenta importante para contribuir para a investigação de potenciais fármacos citoprotetores com relevante aplicação terapêutica nos casos de infecção com ZIKV (Figuras 3, 4, 7, 8, 9, 10).

Em nossos estudos, verificamos a possibilidade de utilizar o bioensaio desenvolvido para a reposição de fármacos já existentes, e utilizados para outras terapias, para inibição do ZIKV. A metodologia também mostrou resultados promissores ao ser adaptada para identificação de candidatos (*hits*) a partir do *screening* de coleções farmacológicas em larga escala, com alvo de identificar futuros candidatos farmacológicos inovadores. Além disso, como o bioensaio baseia-se na utilização de uma célula repórter que atua como um sensor da infecção viral, isso possibilitaria a avaliação de compostos dirigidos à inibição de outros agentes patogênicos que apresentem ciclo lítico, efeito citopático característico, ou mesmo que interfiram de forma deletéria no metabolismo e função celular.

Os fármacos que tiveram sua capacidade antiviral ou citoprotetora sugerida através de nossos estudos poderão ser melhor investigados para descobrir-se as vias de interação e de citoproteção envolvendo o ZIKV, bem como poderão ser avaliados por meio de ensaios *in vivo* para que seus potenciais possam ser confirmados num modelo mais próximo do que ocorre nos humanos. Nosso grupo também está trabalhando com o estudo do efeito terapêutico associado à combinação de moléculas, com alvo de obter sinergias que aumentem a eficiência de inibição viral, aumentem a citoproteção e reduzam a dose e toxicidade relativa. Essa nova ferramenta analítica poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas dirigidas ao controle da infecção por ZIKV, bem como de outros vírus citopáticos emergentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (WHO) World Health Organization. (2017). Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré Syndrome, 10 march 2017. *Situation Report*, (March), 1–5. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254714/1/zikasitrep10Mar17-eng.pdf?ua=1>
- Andre, F. E., Booy, R., Bock, H. L., Clemens, J., & Datta, S. K. (2014). Bulletin of the World Health Organization Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide, 1–12.
- Aubry, F., Nougairède, A., Gould, E. A., & De Lamballerie, X. (2015). Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective. *Antiviral Research*, *114*, 67–85. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.007>
- Bajgelman, M. C., Costanzi-Strauss, E., & Strauss, B. E. (2003). Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. *Journal of Biotechnology*, *103*(2), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00103-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00103-2)
- Balasubramanian, A., Teramoto, T., Kulkarni, A. A., Bhattacharjee, A. K., & Padmanabhan, R. (2016). Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Research*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.015>
- Balasubramanian, A., Teramoto, T., Kulkarni, A. A., Bhattacharjee, A. K., & Padmanabhan, R. (2017). Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Research*, *137*, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.015>
- Bardina, S. V., Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J. J., Brown, J. A., ... Lim, J. K. (2017). Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. *Science*, *356*(6334), 175 LP-180. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/356/6334/175.abstract>
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Powell, S. T., Prasanth, K. R., Schott-Lerner, G., Soto-Acosta, R., ... Garcia-Blanco, M. A. (2016). A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host and Microbe*, *259–270*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.004>
- Beylveeld, G., White, K. M., Ayllon, J., & Shaw, M. L. (2014). Influenza Compounds Targeting Viral and Host Functions, *100*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.018>.New-generation
- Blundell, T. L., Sibanda, B. L., Montalva, R. W., Brewerton, S., Chelliah, V., Worth, C. L., ... Burke, D. (2006). Structural biology and bioinformatics in drug design : opportunities and challenges for target identification and lead discovery, (February), 413–423. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1800>
- Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., ... de Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(6), 653–660. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
- Carneiro, B. M., Batista, M. N., Braga, A. C. S., Nogueira, M. L., & Rahal, P. (2016). The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology*, *496*, 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.012>

- Chan, J. F. W., Choi, G. K. Y., Yip, C. C. Y., Cheng, V. C. C., & Yuen, K. Y. (2016). Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection*, 72(5), 507–524. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
- Chen, Y. L., Yokokawa, F., & Shi, P. Y. (2015). The search for nucleoside/nucleotide analog inhibitors of dengue virus. *Antiviral Research*, 122, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.07.010>
- Cheng, F., Murray, J. L., & Rubin, D. H. (2016). Drug Repurposing : New Treatments for Zika Virus Infection ? *Trends in Molecular Medicine*, xx(11), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.006>
- Ciociola, A. A., Cohen, L. B., Kulkarni, P., Kefalas, C., Buchman, A., Burke, C., ... Vuppalachchi, R. (2014). How Drugs are Developed and Approved by the FDA: Current Process and Future Directions. *The American Journal of Gastroenterology*, 109(5), 620–623. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.407>
- de Araújo, T. V. B., Rodrigues, L. C., de Alencar Ximenes, R. A., de Barros Miranda-Filho, D., Montarroyos, U. R., de Melo, A. P. L., ... Martelli, C. M. T. (2016). Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(12), 1356–1363. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30318-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30318-8)
- Delvecchio, R., Higa, L. M., Pezzuto, P., Valadao, A. L., Garcez, P. P., Monteiro, F. L., ... Tanuri, A. (2016). Chloroquine inhibits Zika Virus infection in different cellular models. *bioRxiv*, 51268. <https://doi.org/10.1101/051268>
- Deng, Y.-Q., Zhang, N.-N., Li, C.-F., Tian, M., Hao, J.-N., Xie, X.-P., ... Qin, C.-F. (2016). Adenosine analog NITD008 is a potent inhibitor of Zika virus. *Open Forum Infectious Diseases*, ofw175. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw175>
- Dick, G. W. A. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>, 2536–2543.
- Ekins, S., Mietchen, D., Coffee, M., Stratton, T. P., Freundlich, J. S., Freitas-Junior, L., ... Andrade, C. (2016). Open drug discovery for the Zika virus. *F1000Research*, 5(0), 150. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8013.1>
- Fauci, Anthony S.; Morens, D. M. (2010). New engla nd journal. *Perspective*, 363(1), 1–3. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1002530>
- Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., ... Sall, A. A. (2014). Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 36. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
- Fernandes, N. C. C. A., Nogueira, J. S., Réssio, R. A., Cirqueira, C. S., Kimura, L. M., Fernandes, K. R., ... Guerra, J. M. (2016). Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. *Experimental and*

Toxicologic Pathology : Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie, 69(2), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.11.004>

- Ferreira de Lima Neto, D., Lorenzon-Ojea, A., Zago Gomes, S., Bandeira, C., Zanotto, P., Palmisano, G., & Bevilacqua, E. (2017). ZIKA virus infection in human placental cells. *Placenta*, 51(2017), 106. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.033>
- Fontes, C., Dos Santos, A., & Marchiori, E. (2016). Magnetic resonance imaging findings in Guillain-Barré syndrome caused by Zika virus infection. *Neuroradiology*, 837–838. <https://doi.org/10.1007/s00234-016-1687-9>
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- Gadea, G., Bos, S., Krejbich-Trotot, P., Clain, E., Viranaicken, W., El-Kalamouni, C., ... Desprès, P. (2016). A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology*, 497, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.015>
- Garvey, C. M., Spiller, E., Lindsay, D., Chiang, C.-T., Choi, N. C., Agus, D. B., ... Mumenthaler, S. M. (2016). A high-content image-based method for quantitatively studying context-dependent cell population dynamics. *Scientific Reports*, 6(1), 29752. <https://doi.org/10.1038/srep29752>
- Goebel, S., Snyder, B., Sellati, T., Saeed, M., Ptak, R., Murray, M., ... Kalkeri, R. (2016). A sensitive virus yield assay for evaluation of Antivirals against Zika Virus. *Journal of Virological Methods*, 238, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.09.015>
- Gulland, A. (2016). Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 352(February), i657. <https://doi.org/10.1136/bmj.i657>
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., ... Misse, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*, 89(17), 8880–8896. <https://doi.org/10.1128/jvi.00354-15>
- Hamel, R., Ferraris, P., Wichit, S., Diop, F., Talignani, L., Pompon, J., ... Missé, D. (2017). African and Asian Zika virus strains differentially induce early antiviral responses in primary human astrocytes. *Infection, Genetics and Evolution*, 49, 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.015>
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug, 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>
- Julander, J. G., Siddharthan, V., Evans, J., Taylor, R., Tolbert, K., Apuli, C., ... Babu, Y. S. (2017). Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. *Antiviral Research*, 137, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.003>
- King, N. J. C. (n.d.). Zika Virus : Mechanisms of Infection During Pregnancy. *Trends in Microbiology*, xx, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.005>
- Kouznetsova, J., Sun, W., Martínez-Romero, C., Tawa, G., Shinn, P., Chen, C. Z., ... García-

- Sastre, A. (2014). Identification of 53 compounds that block Ebola virus-like particle entry via a repurposing screen of approved drugs. *Emerging Microbes and Infections*, 3(12), e84. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.88>
- Kuno, G., & Chang, G. J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, 152(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z>
- Lee, J.-C., Tseng, C.-K., Wu, Y.-H., Kaushik-Basu, N., Lin, C.-K., Chen, W.-C., & Wu, H.-N. (2015). Characterization of the activity of 2'-C-methylcytidine against dengue virus replication. *Antiviral Research*, 116, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.01.002>
- Lessler, J., Chaisson, L. H., Kucirka, L. M., Bi, Q., Grantz, K., Salje, H., ... Rodriguez-Barrquer, I. (2016). Assessing the global threat from Zika virus. *Science*, 46(24), 601–604. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8160>
- Li, F., Wang, P., Qu, L., Yi, C., Zhang, F., Tang, X., ... Chen, L. (2017). LETTER TO THE EDITOR AXL is not essential for Zika virus infection in the mouse brain. *Nature Publishing Group*, (January), 3–4. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.10>
- Lyle Peterson, Jamieson, D., Powers, A., & Honein, M. (2016). Zika Virus. *Centers for Disease Control and Prevention: Zika Virus Home*, (March 2015). <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
- McArthur, M. A. (2017). Zika virus: Recent advances towards the development of vaccines and therapeutics. *Viruses*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/v9060143>
- McAuley, A. J., & Beasley, D. W. C. (2016). Propagation and Titration of West Nile Virus on Vero Cells BT - West Nile Virus: Methods and Protocols. In T. M. Colpitts (Ed.) (pp. 19–27). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3670-0_3
- Miner, J. J., Cao, B., Govero, J., Smith, A. M., Fernandez, E., Cabrera, O. H., ... Diamond, M. S. (2016). Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*, 165(5), 1081–1091. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008>
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Review Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host and Microbe*, 21(2), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Morrison, J., & Plotkin, S. (2016). Viral Vaccines. In *Viral Pathogenesis* (pp. 253–269). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800964-2.00019-7>
- Munjal, A., Khandia, R., Dhama, K., & Sachan, S. (2017). Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus : Current Knowledge and Future Perspectives, 8(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01469>
- Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., ... Brout, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*, 19(14), 14–16. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761>
- Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.011>

- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., & Verma, I. M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11382–11388. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11382>
- Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., ... Trono, D. (1996). In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*, 272(5259), 263 LP-267. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/272/5259/263.abstract>
- Pacheco, O., Beltrán, M., Nelson, C. a, Valencia, D., Tolosa, N., Farr, S. L., ... Ospina Martínez, M. L. (2016). Zika Virus Disease in Colombia - Preliminary Report. *The New England Journal of Medicine*, 1–10. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604037>
- Pankaj, K. (2013). Methods for Rapid Virus Identification and Quantification. *Labome*, 3(207), 1–7. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.207>
- Plotkin, S., Robinson, J. M., Cunningham, G., Iqbal, R., & Larsen, S. (2017). The complexity and cost of vaccine manufacturing – An overview. *Vaccine*, 35(33), 4064–4071. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.003>
- Rabaan, A. A., Bazzi, A. M., Al-Ahmed, S. H., Al-Ghaith, M. H., & Al-Tawfiq, J. A. (2016). Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. *Journal of Infection and Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.05.007>
- Rica, C., & Lucia, S. (2016). Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas , 2015 - 2016 Cumulative cases, (September), 2016.
- Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., ... Diamond, M. S. (2017). Erratum: Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection (Cell (2017) 168(6) (1114–1125.e10)(S0092867417301952)(10.1016/j.cell.2017.02.017)). *Cell*, 169(1), 176. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.016>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
- Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., ... Souarès, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections ??? An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012???2014. *Eurosurveillance*, 19(41). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.41.20929>
- Sahoo, M., Jena, L., Daf, S., & Kumar, S. (2016). Virtual Screening for Potential Inhibitors of NS3 Protein of Zika Virus. *Genomics & Informatics*, 14(3), 104. <https://doi.org/10.5808/GI.2016.14.3.104>
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M. L., Horovitz, D. D. G., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., ... Sanseverino, M. T. V. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(3), 59–62. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>
- Simanjuntak, Y., Liang, J. J., Lee, Y. L., & Lin, Y. L. (2015). Repurposing of

- prochlorperazine for use against dengue virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 211(3), 394–404. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu377>
- Simonin, Y., Loustalot, F., Desmetz, C., Foulongne, V., Constant, O., Fournier-Wirth, C., ... Salinas, S. (2016). Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine*, 12, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.020>
- Smith, J., Lipsitch, M., & Almond, J. W. (2011). Vaccine production, distribution, access, and uptake. *The Lancet*, 378(9789), 428–438. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60478-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60478-9)
- Snyder, B., Goebel, S., Koide, F., Ptak, R., & Kalkeri, R. (n.d.). Synergistic Antiviral activity of Sofosbuvir and Type – I Interferons (α and β) against Zika virus † Abstract :, (August 2017), 1–21. <https://doi.org/10.1002/jmv.24932>
- Soares de Oliveira-Szejnfeld, P., Levine, D., Melo, A. S. de O., Amorim, M. M. R., Batista, A. G. M., Chimelli, L., ... Tovar-Moll, F. (2016). Congenital Brain Abnormalities and Zika Virus: What the Radiologist Can Expect to See Prenatally and Postnatally. *Radiology*, 281(1), 203–218. <https://doi.org/10.1148/radiol.2016161584>
- Strauss, B. E., Patrício, J. R., de Carvalho, A. C. V., & Bajgelman, M. C. (2006). A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: A potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(4), 1411–1418. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.007>
- Sun, J., Li, M., Wang, Y., Hao, P., & Jin, X. (2017). Elaboration of tetravalent antibody responses against dengue viruses using a subunit vaccine comprised of a single consensus dengue envelope sequence. *Vaccine*, 35(46), 6308–6320. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.063>
- Suter, M. A., & Aagaard, K. M. (2016). Disease watch: Zika virus - placental passage and permissivity for infection. *Nature Reviews. Endocrinology*, 12(8), 437–438. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.101>
- Varghese, F. S., Thaa, B., Amrun, S. N., Simarmata, D., Rausalu, K., Nyman, T. A., ... Ahola, T. (2016). The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Journal of Virology*, 90(21), 9743–9757. <https://doi.org/10.1128/JVI.01382-16>
- Wang, Z., Wang, Z., Zhen, Z., Feng, K., Guo, J., Gao, N., ... Barr, G. (2017). Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice, 2061–2068. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000886>
- Wichmann, O., Vannice, K., Asturias, E. J., de Albuquerque Luna, E. J., Longini, I., Lopez, A. L., ... Hombach, J. (2017). Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: The needs and challenges of post-licensure evaluation of vaccine safety and effectiveness. *Vaccine*, 35(42), 5535–5542. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.066>
- Willis, E., & Hensley, S. E. (2017). Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies. *Virology*, 508(May), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.031>
- Wong, G. et al. (2017). Antiviral activity of quercetin-3- β -O-D-glucoside against Zika, 9–11.

<https://doi.org/10.1007/s12250-017-4057-9>

- World Health Organization(WHO). (2017). WHO / UNICEF Zika Virus Vaccine Target Product Profile for Emergency / Outbreak Use WHO / UNICEF Zika Virus Vaccine Target Product Profile for Emergency / Outbreak Use, (November 2016), 1–17. Retrieved from http://www.who.int/immunization/research/development/WHO_UNICEF_Zikavac_TPP_Feb2017.pdf?ua=1
- Xavier-Neto, J., Carvalho, M., Pascoalino, B. dos S., Cardoso, A. C., Costa, Â. M. S., Pereira, A. H. M., ... Franchini, K. (2017). Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent mouse model of ZIKA teratogeny: A developmental study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(2), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005363>
- Xie, X., Zou, J., Shan, C., Yang, Y., Kum, D. B., Dallmeier, K., ... Shi, P.-Y. (2016). Zika Virus Replicons for Drug Discovery. *EBioMedicine*, *12*, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.013>
- Xu, M., Lee, E. M., Wen, Z., Cheng, Y., Huang, W.-K., Qian, X., ... Tang, H. (2016). Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nature Publishing Group*, *22*(10), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nm.4184>
- Ye, Q., Liu, Z.-Y., Han, J.-F., Jiang, T., Li, X.-F., & Qin, C.-F. (2016). Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *43*, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.004>
- Yin, Z., Chen, Y.-L., Schul, W., Wang, Q.-Y., Gu, F., Duraiswamy, J., ... Shi, P.-Y. (2009). An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(48), 20435–20439. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907010106>
- Zanluca, C., & Nunes, C. (2016). Zika virus e an overview. *Microbes and Infection*, *18*(5), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.003>
- Zhou, T., Tan, L., Cederquist, G. Y., Fan, Y., Hartley, B. J., Mukherjee, S., ... Chen, S. (2017). High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. *Cell Stem Cell*, *21*(2), 274–283.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.06.017>
- Zmurko, J., Marques, R. E., Schols, D., Verbeken, E., Kaptein, S. J. F., & Neyts, J. (2016). The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004695>

ANEXO I

Tabela 1: Resumo dos resultados de avaliação dos fármacos utilizando diferentes metodologias de análise

Fármacos	Vírus	Citometria de Fluxo		Titulação		Ensaio de LDH	
		Apresentou potencial antiviral/citoprotetor?	Em qual faixa de concentração?	Apresentou potencial antiviral/citoprotetor?	Em qual faixa de concentração?	Apresentou potencial antiviral/citoprotetor?	Em qual faixa de concentração?
Proclorperazina	ZIKV HBa	Sim	10 µM	Sim	10 µM	NA	-
	ZIKV MR766	Sim	10 µM	Não	-	NA	-
	DENV-2	Não	-	NA	-	NA	-
Amodiaquina	ZIKV HBa	Sim	10 e 20 µM	Sim	10 e 20 µM	Sim	10 e 20 µM
	ZIKV MR766	Sim	10 e 20 µM	Não	-	NA	-
Quinacrina	ZIKV HBa	Não	-	NA	-	NA	-
	ZIKV MR766	NA	-	NA	-	NA	-
Berberina	ZIKV HBa	Não	-	NA	-	NA	-
	ZIKV MR766	Não	-	NA	-	NA	-
2'-C-Metilcitidina	ZIKV HBa	Sim	10 e 20 µM	Não	-	Sim	20 µM
	ZIKV MR766	Não	-	NA	-	NA	-

NA= Não Analisado.

Resultados referentes aos experimentos representados pelas figuras 3 à 12.

ANEXO II

BLAST Results

Blast 2 sequences

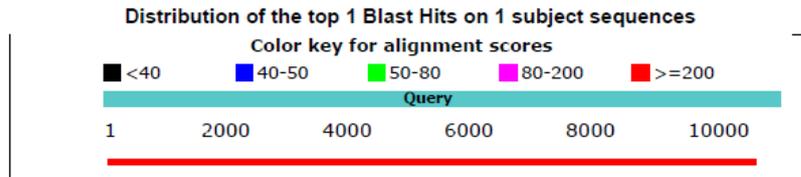
Job title: MR766 pubmed NC_012532 x HBA pubmed KX520666.1

RID [56N6NDPB114](#) (Expires on 01-09 18:24 pm)

Query ID |cl|Query_91339
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 10794

Subject ID |cl|Query_91341
Description None
[See details](#)
Molecule type nucleic acid
Subject Length 10538
Program BLASTN 2.7.1+

Graphic Summary



[Dot Matrix View](#)

[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
None provided	12907	12907	97%	0.0	89%	Query_91341

[Alignments](#)

Sequence ID: Query_91341 Length: 10538 Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 10538

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
12907 bits(8989)	0.0()	9361/10542(89%)	20/10542(0%)	Plus/Plus	

Features:

Query	71	GGTTTAAATGGATTGGAAACGAGAGTTCTGGTCATGAAAAACCCCAAGAAAGAAATC	130
Sbjct	1	GGTTTAAATGGATTGGAAACGAGAGTTCTGGTCATGAAAAA-CCCCAAAAAGAAATC	59
Query	131	CGGAGGA-TCCGGATTGTCAATATGCTAAAACGCGAGTAGCCCGTGTAAACCCCTTGGG	189
Sbjct	60	CGGAGGATCCGGATTGTCAATATGCTAAAACGCGAGTAGCCCGTGTGAGCCCTTTGG	119
Query	190	AGGTTTGAAGAGGTTGCCAGCCGGACTTCTGCTGGGTCATGGACCCATCAGAATGGTTTT	249
Sbjct	120	GGGCTTGAAGAGGCTGCCAGCCGGACTTCTGCTGGGTCATGGGCCATCAGGATGGTCTT	179
Query	250	GGCGATACTAGCCTTTTGAGATTACAGCAATCAAGCCATCACTGGGCCTTATCAACAG	309
Sbjct	180	GGCGATTCTAGCCTTTTGAGATTACGGCAATCAAGCCATCACTGGGCTCATCAATAG	239
Query	310	ATGGGGTCCGTGGGAAAAAAGAGGCTATGGAAATAAAGAAAGTTCAAGAAAGATCT	369
Sbjct	240	ATGGGGTTCAGTGGGAAAAAAGAGGCTATGGAAATAAAGAAAGTTCAAGAAAGATCT	299
Query	370	TGCTGCCATGTTGAGAATAATCAATGCTAGGAAAGAGAGGAAAGACGTGGCGCAGACAC	429
Sbjct	300	GGCTGCCATGCTGAGAATAATCAATGCTAGGAAAGAGAGGAAAGACGAGGCGCAGATAC	359
Query	430	CAGCATCGGAATCATTGGCCCTCTGCTGACTACAGCCATGGCAGCAGAGTCACTAGACG	489
Sbjct	360	TAGTGTGGAATGTTGGCCCTCTGCTGACCACAGCTATGGCAGCGGAGGTCACTAGACG	419
Query	490	CGGGAGTGCATACTACATGTACTTGGATAGGAGCGATGCCGGGAAGGCCATTTCTGTTGC	549
Sbjct	420	TGGGAGTGCATACTATATGTACTTGGACAGAAACGATGCTGGGGAGGCCATATCTTTTCC	479
Query	550	TACCACATTGGGAGTGAACAAGTCCACGTACAGATCATGGACCTCGGACACATGTGTGA	609
Sbjct	480	AACCACATTGGGATGAATAAGTGTATATACAGATCATGGATCTTGGACACATGTGTGA	539
Query	610	CGCCACCATGAGTTATGAGTGCCCTATGCTGGATGAGGGAGTGGAAACGAGATGATGCGA	669
Sbjct	540	TGCCACCATGAGCTATGAATGCCCTATGCTGGATGAGGGGTTGGAAACGAGATGACGTCGA	599
Query	670	TTGCTGGTGCAACACGACATCAACTTGGGTTGTGTACGGAACCTGTCAACAAAAAGG	729
Sbjct	600	TTGTTGGTGCAACACGACGTCACACTTGGGTTGTGTACGGAACCTGCCATCAAAAAAGG	659
Query	730	TGAGGCACGGCGATCTAGAAGAGCCGTGACGCTCCCTTCTCACTCTACAAGGAAGTTGCA	789
Sbjct	660	TGAAGCACGGGATCTAGAAGAGCTGTGACGCTCCCTCCATTCCACTAGGAAGCTGCA	719
Query	790	AACGCGGTCGACAGCCTGGTTAGAATCAAGAGAATACACGAAGCACTTGATCAAGGTTGA	849
Sbjct	720	AACGCGGTCGCAAACTGGTTGGAATCAAGAGAATACACGAAGCACTTGATTAGAGTCGA	779
Query	850	AAACTGGATATTCAGGAACCCCGGGTTGCGCTAGTGGCGTTGCCATTGCCTGGCTTTT	909
Sbjct	780	AAATTGGATATTCAGGAACCTGGCTTCGCTTAGCAGCAGCTGCCATCGCTTGGCTTTT	839
Query	910	GGGAAGCTCGACGAGCCAAAAAGTCATATCTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCGGC	969
Sbjct	840	GGGAAGCTCAACGCGCCAAAAAGTCATATCTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCGGC	899
Query	970	ATACAGTACAGGTGCATTGGAGTCAGCAATAGAGACTTCGTGGAGGGCATGTCAGGTTG	1029
Sbjct	900	ATACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGATGTCAGGTTG	959
Query	1030	GACCTGGGTTGATGTTGTCTTGGAAACATGGAGGCTGCGTTACCGTGATGGCAGGACAA	1089
Sbjct	960	GACTTGGGTTGATGTTGTCTTGGAAACATGGAGGTTGTGTCACCGTAATGGCAGGACAA	1019
Query	1090	GCCAACAGTCGACATAGAGTTGGTCAAGCAGCGGTTAGTAACATGGCCGAGGTAAGATC	1149
Sbjct	1020	ACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTCAACCAACAGTCAGCAACATGGCCGAGGTAAGATC	1079

Query 1150 CTATTGCTACGAGGCATCGATATCGGACATGGCTTCGGACAGTCGTTGCCCAACACAAGG 1209
 Sbjct 1080 CTAAGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCCAACACAAGG 1139
 Query 1210 TGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAAGAACATAGTGG 1269
 Sbjct 1140 TGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAAGAACGTTAGTGG 1199
 Query 1270 CAGAGGTTGGGAAACGGTGTGGACTTTTGGCAAAAGGAGCTTGGTGCATGTGCCAA 1329
 Sbjct 1200 CAGAGGTTGGGAAATGGATGTGGACTTTTGGCAAAAGGAGCTTGGTGCATGTGCCAA 1259
 Query 1330 GTTACGTGTTCTAAGAAAGATGACCGGGAAAGAGCATTCAACCGGAAAACTGGAGTATCG 1389
 Sbjct 1260 GTTTCATGCTCCAAGAAAAAGACCGGGAAAGAGCATTCAAGCCAGAGAACTGGAGTACCG 1319
 Query 1390 GATAATGCTATCAGTGCATGGCTCCCAGCATAGCGGGATGATTGGATATG--A--A--AC- 1443
 Sbjct 1320 GATAATGCTGTCAAGTTCATGGCTCCCAGCACAGTGGGATGATCGTTAATGACACAGGACA 1379
 Query 1444 TG--AC-GA--AG-ATAGAGCGAAAGTCGAGGTACGCCATAATCACCAGAGCGGAAAGC 1497
 Sbjct 1380 TGAACCTGATGAGAAATAGAGCGAAAGTTGAGATAACGCCCAATTCACCAGAGCGGAAAGC 1439
 Query 1498 AACCTTGGGAGGCTTGGAAAGCTTAGGACTTGACTGTGAACCAAGGACAGGCTTGA 1557
 Sbjct 1440 CACCTTGGGGGGTTTGGAAAGCTTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCTTGA 1499
 Query 1558 TTCAGATCTGATTAACCTGACCATGAACAATAAGCATTGGTTGGTGCACAAAAGAGTGG 1617
 Sbjct 1500 TTCAGATTGTATTACTTGAATGAATAACAAGCACTGGTTGGTGCACAAAAGAGTGG 1559
 Query 1618 TCATGACATCCCATGGCTTGGCATGCTGGGGCAGACACCGGAACTCCACACTGGAAACA 1677
 Sbjct 1560 CCACGACATTCCATTACCTTGGCAGCTGGGGCAGACACCGGAACTCCACACTGGAAACA 1619
 Query 1678 CAAAAGGCGATTGGTGAATCAAGGATGCCACGCAAGAGGCAAAACCGTGTGTTCT 1737
 Sbjct 1620 CAAAAGGCGATTGGTGAATCAAGGATGCCACGCAAGAGGCAAAACCGTGTGTTCT 1679
 Query 1738 GGGGAGCCAGGAAAGGAGCCGTTACACGGCTCTCGTGGAGCTCTAGAGGCTGAGATGGA 1797
 Sbjct 1680 AGGGAGTCAAGAAAGGAGCAGTTACACGGCTCTCGTGGAGCTCTAGAGGCTGAGATGGA 1739
 Query 1798 TGGTGCAAAAGGGAAGGCTGTCTCTGGCCATTTGAAATGCCGCCATAAAATGGACAAGCT 1857
 Sbjct 1740 TGGTGCAAAAGGGAAGGCTGTCTCTGGCCATTTGAAATGCCGCCATAAAATGGATAAAT 1799
 Query 1858 TAGATTGAAAGGCGTGTCAATTCCTTGTGCACTGCGGCAATCACATTCAACAAAGTCCC 1917
 Sbjct 1800 TAGATTGAAAGGCGTGTCAATTCCTTGTGCACTGCGGCAATCACATTCAACAAAGTCCC 1859
 Query 1918 AGCTGAAACACTGCATGGAAAGTCAAGTGGAGGTCAGTATGCAGGGACAGATGGACC 1977
 Sbjct 1860 GGCTGAAACACTGCATGGAAAGTCAAGTGGAGGTCAGTATGCAGGGACAGATGGACC 1919
 Query 1978 CTGCAAGATCCCAGTCCAGATGGCGGTGGACATGCAGACCTTGAACCCAGTGGAAAGCT 2037
 Sbjct 1920 TTGCAAGATCCCAGTCCAGATGGCGGTGGACATGCAGACCTTGAACCCAGTGGAAAGCT 1979
 Query 2038 GATAACCCGCAACCCCGTGAATTAAGCACTGAGAACTCAAAGATGATGTTGGAGCT 2097
 Sbjct 1980 GATAACCCGCAACCCCGTGAATTAAGCACTGAGAACTCAAAGATGATGTTGGAGCT 2039
 Query 2098 TGACCCACCATTTGGGGATCTTACATTGTCAATGGAGTGGGGCAAGAAAAATCACCCA 2157
 Sbjct 2040 TGATCCACCATTTGGGGATCTTACATTGTCAATGGAGTGGGGCAAGAAAAATCACCCA 2099
 Query 2158 CCACTGGCATAGGAGTGGTGCAGCACCATCGGAAAGGCAATGAGGCACTGTGAGAGGCGC 2217
 Sbjct 2100 CCACTGGCATAGGAGTGGTGCAGCACCATCGGAAAGGCAATGAGGCACTGTGAGAGGCGC 2159
 Query 2218 CAAGAGAAAGGAGTCTGGGGATACAGCCTGGGACTCGGATCAGTGGGGGTGTGTT 2277
 Sbjct 2160 CAAGAGAAAGGAGTCTGGGGATACAGCCTGGGACTCGGATCAGTGGGGGTGTGTT 2219
 Query 2278 CAACTCACTGGGTAAAGGCAATCACAGATTTTGGAGCAGCCTCAAATCACTGTTGG 2337
 Sbjct 2220 CAACTCACTGGGTAAAGGCAATCACAGATTTTGGAGCAGCCTCAAATCACTGTTGG 2279
 Query 2338 AGGAATGTCTGTTCTCACAGATCCTCATAGGCAAGGCTGCTAGTGTGGTTAGGTTTGA 2397
 Sbjct 2280 AGGAATGTCTGTTCTCACAGATCCTCATAGGCAAGGCTGCTAGTGTGGTTAGGTTTGA 2339
 Query 2398 CACAAAAGAAAGGATCTATCTCCCTCACATGCTTGGCCCTGGGGGGAGTGTATCTCT 2457
 Sbjct 2340 CACAAAAGAAAGGATCTATCTCCCTCACATGCTTGGCCCTGGGGGGAGTGTATCTCT 2399
 Query 2458 CTCACGGCTGTTCTGCTGACGTGGGGTCTCAGTGSACTTCAAAAAAGGAAACGAG 2517
 Sbjct 2400 ATCCACAGCCGCTCTGCTGATGTGGGGTCTCGGTGGACTTCAAAAAAGGAAACGAG 2459
 Query 2518 ATGTGGCACGGGGGATTCATCTATAATGATGTTGAAAGCCTGGAGGGACCGGTACAAAGTA 2577
 Sbjct 2460 ATGTGGCACGGGGGATTCATCTATAATGATGTTGAAAGCCTGGAGGGACCGGTACAAAGTA 2519
 Query 2578 CCATCCTGACTCCCCCGCAGATTGGCAGCAGCAGTCAAGCAGGCTGGGAAAGGGGGAT 2637
 Sbjct 2520 CCATCCTGACTCCCCCGCAGATTGGCAGCAGCAGTCAAGCAGGCTGGGAAAGGGGGAT 2579
 Query 2638 CTGTGGGATCTCATCCGTTCAAGAAAGGAAAAATCATGTGGAAATCAGTAGAAGGGGA 2697
 Sbjct 2580 CTGTGGGATCTCATCCGTTCAAGAAAGGAAAAATCATGTGGAAATCAGTAGAAGGGGA 2639
 Query 2698 GCTCAATGCTATCCTAGAGGAGAAATGGAGTCAACTGACAGTGTGTTGGGATCTGTAAA 2757
 Sbjct 2640 GCTCAACGCAATCCTGGAAAGAGAAATGGAGTCAACTGACAGTGTGTTGGGATCTGTAAA 2699
 Query 2758 AAACCCCATGTGGAGAGGTTCCACAAGATTTGCCAGTGCCTGTGAATGAGCTGCCCATAG 2817
 Sbjct 2700 AAACCCCATGTGGAGAGGTTCCACAAGATTTGCCAGTGCCTGTGAATGAGCTGCCCATAG 2759

Query 2818 CTGGAAAGCCTGGGGGAAATCGTATTTGTTAGGGCGGCAAGACCAACAACAGTTTTGT 2877
 Sbjct 2760 CTGGAAAGCCTGGGGGAAATCGTACTTCGTGAGGACGCAAGACAAATAACAGCTTTGT 2819
 Query 2878 TGTGACGGTGCACACTGAAGGAATGTCGCTTGAGCACAGAGCATGGAAATGTTTTCT 2937
 Sbjct 2820 CGTGGATGGTGCACACTGAAGGAATGCCCACTCAAACATAGAGCATGGAAACAGCTTTCT 2879
 Query 2938 TGTGGAGGATCACGGGTTTGGAGTCTTCCACACCAAGTCTGGCTTAAGGTGAGAGAA 2997
 Sbjct 2880 TGTGGAGGATCATGGGTTCCGGGATTTTCACTAGTGTCTGGCTCAAGGTTAGAGAA 2939
 Query 2998 TTACTCATTAGAATGTGACCCAGCCGTATAGGAACAGCTGTTAAGGGAAAGGAGGCCGC 3057
 Sbjct 2940 TTATTCATTAGAGTGTGATCCAGCCGTTATTGGAACAGCTGTTAAGGGAAAGGAGGCTGT 2999
 Query 3058 GCACAGTGATCTGGGCTATTGGATTGAAAGTGAAAGAAATGACACATGGAGGCTGAAGAG 3117
 Sbjct 3000 ACACAGTGATCTAGGCTACTGSAATTGAGAGTGAAGAAATGACACATGGAGGCTGAAGAG 3059
 Query 3118 GGGCCACCTGATTGAGATGAAACATGTGAATGGCCAAAGTCTCACACATTGTGGACAGA 3177
 Sbjct 3060 GGGCCATCTGATCGAGATGAAACATGTGAATGGCCAAAGTCCACACATTGTGGACAGA 3119
 Query 3178 TGGAGTAGAAGAAAGTGTATCATACCCAAGTCTTAAAGTGGTCCACTCAGCCACCA 3237
 Sbjct 3120 TGGAAATGAGAGAGTGTGATCTGATCATACCCAAGTCTTAAAGTGGTCCACTCAGCCATCA 3179
 Query 3238 CAACACAGAGAGGGTTACAGAACCCAAGTGAAAGGGCCATGGCACAGTGAAGAGCTTGA 3297
 Sbjct 3180 CAATACAGAGAGGGTACAGGACCCAATGAAAGGGCCATGGCACAGTGAAGAGCTTGA 3239
 Query 3298 AATCCGGTTTGAAGAAATGTCAGGACCAAGGTTTACGTGGAGGAGACATGCCGAACTAG 3357
 Sbjct 3240 AATTCGGTTTGAAGAAATGCCAGGCACTAAGGTTCCAGTGGAGGAAACATGTGGAAACAG 3299
 Query 3358 AGGACCATCTCTGAGATCAACTACTGCAAGTGGAAAGGTCATTGAGGAATGGTGTGTAG 3417
 Sbjct 3300 AGGACCATCTCTGAGATCAACTACTGCAAGGAGGAGGGTGTGAGGAATGGTGTGTAG 3359
 Query 3418 GGAATGCACAAATGCCCCCACTATCGTTTCGAGCAAAAGACGGCTGCTGGTATGGAATGGA 3477
 Sbjct 3360 GGAATGCACAAATGCCCCCACTGTCGTTCCGGGCTAAGAGTGGCTGTTGGTATGGAATGGA 3419
 Query 3478 GATAAGGCCCAGGAAAGAACAGAGAGCAACTTAGTGAAGTCAATGGTGAAGCAGCGGGTC 3537
 Sbjct 3420 GATAAGGCCCAGGAAAGAACAGGAAAGCAACTTAGTGAAGTCAATGGTGAAGCAGGATC 3479
 Query 3538 AACCGATCATAAGGACACTTCTCTCTTGGAGTGTGTGATTCTACTCATGGTGCAGGA 3597
 Sbjct 3480 AACTGATCATAAGGATCACTTCTCTCTTGGAGTGTGTGATTCTACTCATGGTGCAGGA 3539
 Query 3598 GGGGTTGAAGAAAGAGAAATGACCACAAAGATCATCATGAGCACATCAATGGCAGTGTGGT 3657
 Sbjct 3540 AGGGCTGAAGAAAGAGAAATGACCACAAAGATCATCATGAGCACATCAATGGCAGTGTGGT 3599
 Query 3658 AGTCATGATCTTGGAGGATTTTCAATGAGTGACCTGGCCAAAGTGTGATCCTGATGGG 3717
 Sbjct 3600 AGTCATGATCCTGGAGGATTTTCAATGAGTGACCTGGCTAAGCTTGAATTTGATGGG 3659
 Query 3718 TGTACTTTCGCAAGAAATGAACACTGGAGGAGATGTAGCTCACTGGCATGGTATGGTGGC 3777
 Sbjct 3660 TGTCACTTTCGCAAGAAATGAACACTGGAGGAGATGTAGCTCACTGGCCTGATAGCAGC 3719
 Query 3778 ATTTAAAGTCAGACCAAGCCTTGTCTCTCTTCAATTTTCAAGGCAATGGACACCCCG 3837
 Sbjct 3720 ATTTAAAGTTAGACCAAGCCTTGTCTCTCTTCAATTTTCAAGGCAATGGACACCCCG 3779
 Query 3838 TGAGAGCATGCTGCTAGCCCTGGCTCGTGTCTTCTGCAAACTGCGATCTCTGCTCTT-G 3896
 Sbjct 3780 TGAAAGCATGCTGCTAGCCCTGGCTCGTGTCTTCTGCAAACTGCGATCTCTGCTCTT-G 3838
 Query 3897 AAGGTGACTTGTGGTCTCATTAATGGAATTTGCTTTGGCCCTGGTGGCAATTCGAGCAA 3956
 Sbjct 3839 AAGGCACCTGTGGTCTCATTAATGGAATTTGCTTTGGCCCTGGTGGCAATTCGAGCAA 3898
 Query 3957 TGCCGTCGACGCACTGACAACTGCTCTACCAATCTGGCTGCTTAACACCACTAG 4016
 Sbjct 3899 TGGTTGTTCCAGCACTGATAACACTACCTTGGCAATCTTGGCTGCTGACACCACTGG 3958
 Query 4017 CTCGAGGCACTGCTCGTGGCATGGAGAGCGGGCCTGGCTACTTGTGGAGGATCATGC 4076
 Sbjct 3959 CCCGGGGCACACTGCTTGTGGCGTGGAGAGCAGGCCCTTGTACTTGGCGGGGGTTTATGC 4018
 Query 4077 TCCTCTCCCTGAAAGGGAAAGGTAGTGTGAAGAAAGAACTGCCATTTGTATGGCCCTGG 4136
 Sbjct 4019 TCCTCTCTGAAAGGGAAAGGAGTGTGAAGAAAGAACTTACCAATTTGTATGGCCCTGG 4078
 Query 4137 GATTGACAGCTGTGAGGGTAGTAGACCTATTAATGTGGTAGGACTACTGTTACTCACAA 4196
 Sbjct 4079 GACTAACCGCTGTGAGGCTGGTGCAGCCCATCAAGTGGTGGGACTGCTGTTGCTCACAA 4138
 Query 4197 GSAAGTGGAAAGCGAGCTGGCCCCCTAGTGAAGTTCACAGCCGTTGGCCCTGATATGTG 4256
 Sbjct 4139 GSAAGTGGAAAGCGAGCTGGCCCCCAAGGAGTACTCACAGCTGTTGGCCCTGATATGTG 4198
 Query 4257 CACTGGCCGGAGGGTTGCCAAGGCAAGCATGAGATGGCTGGACCCATGGCTGCAAGTAG 4316
 Sbjct 4199 CATTGGCTGGAGGGTTGCCAAGGCAAGATAGAGATGGCTGGCCCATGGCCGCGGTCG 4258
 Query 4317 GCTTGTCAATGTGAGCTATGTGGTCTCGGAAAGAGTGGGACATGTACATTGAAAGAG 4376
 Sbjct 4259 GTCTGTCAATGTGAGTACGTGGTCTCAGGAAAGAGTGGGACATGTACATTGAAAGAG 4318
 Query 4377 CAGGTGACATCAGATGGGAAAAAGGACGCGGAAAGTCACTGGAAACAGTCTCGGCTGACG 4436
 Sbjct 4319 CAGGTGACATCAGATGGGAAAAAGATGGGAAAGTCACTGGAAACAGTCTCGGCTGACG 4378
 Query 4437 TGGCACTGGATGAGAGTGGTGAATCTCTCTTGGTGAAGGAGATGGTCCACCCATGAGAG 4496
 Sbjct 4379 TGGCGTAGATGAGAGTGGTGAATCTCTCTTGGTGAAGGATGGTCCACCCATGAGAG 4438

Query	4497	AGATCATACTCAAGGTGGTCTGATGGCCATCTGTGGCATGAACCCAATAGCTATACTT	4556
Sbjct	4439	AGATCATACTCAAGGTGGTCTGATGACCATCTGTGGCATGAACCCAATAGCCATACCTT	4498
Query	4557	TTGCTGCAGGAGCGTGGTATGTGTATGTGAAGACTGGGAAAAGGAGTGGCCCTCTGGG	4616
Sbjct	4499	TTGCACTGGAGCGTGGTACGTATACGTGAAGACTGGGAAAAGGAGTGGTCTCTATGGG	4558
Query	4617	ACGTGCCCTGCTCCCAAAGGTGAAGAAAAGGAGAGACCAAGATGGAGTGTACAGAGTGA	4676
Sbjct	4559	ATGTGCCCTGCTCCCAAAGGAGTAAAAAGGGGGAGACCAAGATGGAGTGTACAGAGTAA	4618
Query	4677	TGACTCGCAGACTGCTAGGTTCAACACAGGTTGGAGTGGGAGTCATGCAAGAGGGAGTCT	4736
Sbjct	4619	TGACTCGTAGACTGCTAGGTTCAACACAAAGTTGGAGTGGGAGTTATGCAAGAGGGGCTCT	4678
Query	4737	TCCACACCATGTGGCAGTTACAAAAGGAGCCGCACTGAGGAGCGGTGAGGGAAAGACTTG	4796
Sbjct	4679	TTCACACTATGTGGCAGTCAAAAAGGATCCGCGCTGAGGAGCGGTGAGGGAGACTTG	4738
Query	4797	ATCCATACTGGGGGATGTCAAGCAGGACTTGGTGTCACTGTGGGCCTTGGAAAGTTGG	4856
Sbjct	4739	ATCCATACTGGGGAGATGTCAAGCAGGACTTGGTGTCACTGTGGTCCATGGAAAGCTAG	4798
Query	4857	ATGCAGCTTGGGATGGACTCAGCGAGGTACAGCTTTGGCCGTACCTCCCGAGAGAGGG	4916
Sbjct	4799	ATGCCGCTTGGGACGGGCAAGCAGAGGTGCAAGCTTTGGCCGTGGCCCCCGGAGAGAGAG	4858
Query	4917	CCAGAAAATTACAGACCTGCTTGGAAATTCAGAGCAAAAGGAGCGGGGACATCGGAGCAG	4976
Sbjct	4859	CGAGGAACTCCAGACTTGCCTGGAAATTTAAGACAAAGGGTGGGSACTTGGAGCGG	4918
Query	4977	TTGCTCTGGACTACCTTGCAGGGACCTCAGGATCTCGGATCTAGACAATGTGGAAAGG	5036
Sbjct	4919	TTGCGCTGGATTACCCAGCAGGAACTTCAGGATCTCCAACTTAGACAAGTGTGGGAGAG	4978
Query	5037	TGATAGGACTCTATGGCAATGGGTGTGATCAAGAAATGGAAAGCTATGTTAGTGTATAA	5096
Sbjct	4979	TGATAGGACTTTATGGCAATGGGTGTGATCAAAAATGGGAGTTATGTTAGTGTCCATCA	5038
Query	5097	CCCAGGGAAAAGGAGGGAGGAGGAGACTCCGGTTGAATGTTTCAACCCCTCGATGCTGAAAG	5156
Sbjct	5039	CCCAGGGAGGAGGGAGGAAAGAGACTCTCTGTGAGTGTCTCGAGCCTTCGATGCTGAAAG	5098
Query	5157	AGAAGCAGCTAACTGTCTTGGATCTGCATCCAGGAGCCGAAAAACAGGAGAGTCTTC	5216
Sbjct	5099	AGAAGCAGCTAACTGTCTTAGACTTGCATCTGGAGCTGGGAAAACAGGAGAGTCTTC	5158
Query	5217	CTGAAATAGTCCGTGAAGCCATAAAAAAGAGACTCCGGCAGTGTCTTGGCACCAACTA	5276
Sbjct	5159	CTGAAATAGTCCGTGAAGCCATAAAAAAAGACTCCGTACTGTGATCTTAGCTCCAACCA	5218
Query	5277	GGTTGTGCTGCTGAGATGGAGGAGGCCCTGAGAGGACTCCGGTGCCTTACATGACAA	5336
Sbjct	5219	GGTTGTGCTGCTGAAATGGAGGAAAGCCCTTAGAGGGCTTCCAGTGCCTTATATGACAA	5278
Query	5337	CAGCAGTCAACGTCACCCATTCTGGGACAGAAATCGTGTATTTGATGTGCCATGCCACTT	5396
Sbjct	5279	CAGCAGTCAATGTCAACCACTCTGGAAACAGAAATCGTGCATTAATGTGCCATGCCACTT	5338
Query	5397	TCACCTCACGCTACTACAACCCATCAGAGTCCCTAATACAATCTCAACATCATGGATG	5456
Sbjct	5339	TCACCTCACGCTACTACAGCCAACTCAGAGTCCCCAATTAATCTGTATATATGGATG	5398
Query	5457	AAGCCCACTTCAAGAGCCCTCAAGTATAGCTGCAAGAGGATACATATCAACAAGGGTTG	5516
Sbjct	5399	AGGCCCACTTCAAGATCCCTCAAGTATAGCAGCAAGAGGATACATTTCAACAAGGGTTG	5458
Query	5517	AAATGGGCGAGGCGCTGCCATTTTATGACTGCCACACCAGGAAACCCGTGATGCGT	5576
Sbjct	5459	AGATGGGCGAGGCGCTGCCATCTTCATGACCGCCACGCCACCAGGAAACCCGTGACGAT	5518
Query	5577	TTCTGACTCTAACTCACCATCATGGACACAGAGTGGAAAGTCCAGAGAGAGCCTTGG	5636
Sbjct	5519	TTCCGGACTCCAACCTCACCATTAATGGACACCGAAAGTGGAAAGTCCAGAGAGAGCCTTGG	5578
Query	5637	GCTCAGGCTTTGATTGGGTGACAGACCACTTGGGAAAAACAGTTGGTTCGTTCCAAGCG	5696
Sbjct	5579	GCTCAGGCTTTGATTGGGTGACGGATCACTTGGAAAAACAGTTGGTTGTTCCAAGCG	5638
Query	5697	TGAGAAAACGGAAATGAAATCGCAGCTGTCTGACAAAAGGCTGGAAAAGCGGTATACAGC	5756
Sbjct	5639	TGAGGAAACGGCAATGAGATCGCAGCTGTCTGACAAAAGGCTGGAAAACGGGTATACAGC	5698
Query	5757	TCAGCAGGAAGACTTTTGGAGACAGAAATTCAGAAAACAAAAATCAAGAGTGGGACTTTG	5816
Sbjct	5699	TCAGCAGAAAGACTTTTGGAGACAGAGTTCCAGAAAACAAAAATCAAGAGTGGGACTTTG	5758
Query	5817	TCATAACAACGACATCTCAGAGATGGGCGCAACTTCAAGGCTGACCAGGTCATAGACT	5876
Sbjct	5759	TCGTGACAACTGACATTTAGAGATGGGCGCAACTTAAAGCTGACCAGGTCATAGATT	5818
Query	5877	CTAGGAGATGCTTAAACCAAGTCATACTTGTGGTGGAGAGGATCATCTTGGCTGGGCCCA	5936
Sbjct	5819	CCAGGAGATGCTTAAAGCCGTCATACTTGTGGCAGAGAGGATCATCTTGGCTGGGCCCA	5878
Query	5937	TGCTGTGACGATGCTAGTGTGCTCAGAGGAGAGGAGTATAGGCAGGAAACCCATAACA	5996
Sbjct	5879	TGCTGTGACACATGCCAGCGCTGCCAGAGGAGGGGGGCGATAGGCAGGAAATCCCAACA	5938
Query	5997	AACCTGGAGATGAGTACATGTATGGAGGTGGGTGTGACAGAGACTGATGAAAGCCATGCAC	6056
Sbjct	5939	AACCTGGAGATGAGTATCTGTATGGAGGTGGGTGTGACAGAGACTGACGAAAGCCATGCAC	5998
Query	6057	ACTGGCTTGAAGCAAGAATGCTTCTTGCACACATCTACCTCCAGGATGGCCTCATAGCCT	6116
Sbjct	5999	ACTGGCTTGAAGCAAGAATGCTCTTGCACAAATTTACCTCCAGGATGGCCTCATAGCCT	6058
Query	6117	CGCTCTATCGGCTGAGGCCGATAAGGTAGCCGCCATTGAGGGAGAGTTAAGCTGAGGA	6176
Sbjct	6059	CGCTCTATCGACTGAGGCCGACAAAGTAGCAGCATTGAGGGAGAGTTCAAGCTTAGGA	6118

Query 6177 CAGAGCAAAGGAAGACCTTCGTGGAACCTCATGAAGAGAGGAGACCTCCCGTCTGGCTAG 6236
 Sbjct 6119 CGGAGCAAAGGAAGACCTTTGTGGAACCTCATGAAAAGAGGAGATCTTCTGTTTGGCTGG 6178
 Query 6237 CCTATCAGGTTGCATCTGCCGGAATAACTTACACAGACAGAAAGATGGTGTCTTGTATGGCA 6296
 Sbjct 6179 CCTATCAGGTTGCATCTGCCGGAATAACTTACACAGATAGAAAGATGGTGTCTTGTATGGCA 6238
 Query 6297 CAACCAACAACACCATAATGGAAGACAGTGTACCAGCAGAGGTTTGGACAAAGATGGAG 6356
 Sbjct 6239 CGACCAACAACACCATAATGGAAGACAGTGTGCCGACAGAGGTTGTGGACCAAGACACGGAG 6298
 Query 6357 AGAAGAGAGTGTCAAACCGAGATGGATGGATGCTAGGGTCTGTTCAGACCATGCGGCCC 6416
 Sbjct 6299 AGAAAAGAGTGTCAAACCGAGGTTGGATGGATGCCAGAGTTTGTTCAGATCATGCGGCCC 6358
 Query 6417 TGAAGTCGTTCAAAGAAATTCGCCGCTGGAAAAGAGGAGCGGCTTTGGAGTAAATGGAGG 6476
 Sbjct 6359 TGAAGTCATTCAAAGAGTTTGCCTGGGAAAAGAGGAGCGGCTTTGGAGTGAATGGAGG 6418
 Query 6477 CCCTGGGAACACTGCCAGGACACATGACAGAGAGGTTTCAGGAAGCCATTGACAACTCG 6536
 Sbjct 6419 CCCTGGGAACACTGCCAGGACACATGACAGAGAGATTCCAGGAAGCCATTGACAACTCG 6478
 Query 6537 CCGTGTCTATGCGAGCAGAGACTGGAAGCAGGCTTATAAGGCAAGCGGACGCCAACTGC 6596
 Sbjct 6479 CTGTGTCTATGCGGGCAGAGACTGGAAGCAGGCTTACAAGCCGCGGCGGCCAAATGC 6538
 Query 6597 CGGAGACCTTAGAGACCATATGCTCTTAGGTTTGTCTGGGAACAGTTTCACTGGGGATCT 6656
 Sbjct 6539 CGGAGACCTTAGAGACCATATGCTCTTAGGTTTGTCTGGGAACAGTTTCACTGGGGATCT 6598
 Query 6657 TCTTCGTCTTGTATGCGAATAAGGGCATCGGGAAGATGGCTTTGGAATGGTAACTTTG 6716
 Sbjct 6599 TTTTCGTCTTGTATGAGSAACAAGGGCATAGGSAAGATGGCTTTGGAATGGTAACTTTG 6658
 Query 6717 GGGCCAGTGCATGGCTCATGTGGCTTCGGAAATGAAACAGCCAGAAATGCATGTGTCC 6776
 Sbjct 6659 GGGCCAGCGCATGGCTCATGTGGCTTCGGAAATGAGCCAGCCAGAAATGCATGTGTCC 6718
 Query 6777 TCATTGTGTGTTTATTACTGGTGGTGTCTACACCGAGCCAGAGAAAGCAAAGATCTC 6836
 Sbjct 6719 TCATTGTGTGTTTCTATTGCTGGTGGTGTCTACACCGAGCCAGAAAGCAAAGATCTC 6778
 Query 6837 CCCAAGATAACCAGATGGCAATATCATCATGGTGGCAGTGGGCCCTTCTAGGTTGATAA 6896
 Sbjct 6779 CCCAAGSAACCAATGGCAATCATCATCATGGTAGCAGTAGGTTCTTGGGCTTGATTA 6838
 Query 6897 CTGCAACGAACTTGGATGGCTGGAAAAGAACAAAAATGACATA-GCTCATCTAATGGGA 6955
 Sbjct 6839 CCGCCAATGAACTCGGATGGTTGGAGAGAACAAAGAGTGAACCTAAGC-CATCTAATGGGA 6897
 Query 6956 AGGAGAGAGAGAGGAGCAACCATGGGATTCGAATGSAATTGATCTGGGCCAGCCTCC 7015
 Sbjct 6898 AGGAGAGAGAGAGGAGCAACCATAGGATTCTGAATGSAATTGACTGCGGCCAGCCTCA 6957
 Query 7016 GCCTGGGCTACTATGCCGCAATGACAACCTCATCACCCCAAGCTGTCCAACATGCGGTA 7075
 Sbjct 6958 GCTTGGGCCATCTATGCTGCCCTGACAACCTTCAATACCCCAAGCGTCCAACATGCAGTG 7017
 Query 7076 ACCACTTCATACAACTACTCCTTAATGGGATGGCCACCAAGCTGGAGTGTGTTT 7135
 Sbjct 7018 ACCACTTCATACAACTACTCCTTAATGGGATGGCCACCAAGCTGGAGTGTGTTT 7077
 Query 7136 GGCATGGGCAAGGGATGCCATT-TATGCATGGGGACCTTGGAGTCCCCTGCTAATGAT 7194
 Sbjct 7078 GGTATGGGCAAGGGATGCCATTCACGCAT-GGGACTTTGGAGTCCCCTGCTAATGAT 7136
 Query 7195 GGGTTGCTATTCACAATTAACACCCCTGACTCTGATAGTAGCTATCAATCTGCTGTGGC 7254
 Sbjct 7137 AGTTGCTACTCACAATTAACACCCCTGACCTAATAGTGGCCATCAATTTGCTGTGGC 7196
 Query 7255 GCACTACATGTACTTGAATCCAGGCCACAAAGCGGCAAGCGGCTGCTGCCAGAAAAG 7314
 Sbjct 7197 GCACTACATGTACTTGAATCCAGGCCAGGCAAGCGGCTGCGCGTGTGCCAGAAAAG 7256
 Query 7315 GACAGCAGCTGGCATCATGAAGAATCCCCTTGTGGATGGAATAGTGGTAACTGACATTGA 7374
 Sbjct 7257 AACGGCAGCTGGCATCATGAAGAACCCTGTTGTGGATGGAATAGTGGTAACTGACATTGA 7316
 Query 7375 CACAATGACAAATAGACCCCAAGTGGGAGAGAGATGGGACAAAGTACTCATAGCAAT 7434
 Sbjct 7317 CACAATGACAAATGACCCCAAGTGGGAGAAAAGATGGGACAGGTGCTACTCATAGCAAT 7376
 Query 7435 AGCCATCTCCAGTGTGCTGCTGCTGCGGACCCTGGGGATGGGGGAGGCTGGAAGCTCT 7494
 Sbjct 7377 AGCCGCTCTCCAGCGCCACTACTGCTGCGGACCCTGGGGATGGGGGAGGCTGGGGCTCT 7436
 Query 7495 GATCACAGCAGCGACTCCACCTTGTGGGAAGGCTCTCCAAAACAAATCTGGAACCTCTC 7554
 Sbjct 7437 GATCACAGCGCAACTCCACTTGTGGGAAGGCTCTCCGAAACAAAGTACTGGAACCTCTC 7496
 Query 7555 TACAGCCACTCACTGTGCAACATCTTACAGAGGAAGCTATCTGGCAGGAGCTTCCCTTAT 7614
 Sbjct 7497 TACAGCCACTCACTGTGTAACATTTTTAGGGGAAGTTACTTGGCTGGAGCTTCTCAAT 7556
 Query 7615 CTATACAGTGAAGAGAAACGCTGGCCTGGTTAAGAGAGCTGGAGGTTGGGACGGGAGAGAC 7674
 Sbjct 7557 CTACACAGTAAACAAGAAACGCTGGCTTGGTCAAGAGAGCTGGGGGTTGGAACAGGAGAGAC 7616
 Query 7675 TCTGGGAGAGAAATGGAAAGGCTCGTCTGAATCAGATGTCGGCCCTGGAGTTCTACTCTTA 7734
 Sbjct 7617 CCTGGGAGAGAAATGGAAAGGCTCGTCTGAATCAGATGTCGGCCCTGGAGTTCTACTCTTA 7676
 Query 7735 TAAAAAGTCAGGATCACTGAAAGTGTGTAGAGAGGAGGCTCGCCGTGCCCTCAAGGATGG 7794
 Sbjct 7677 CAAAAAGTCAGGATCACTGAAAGTGTGTAGAGAGGAGGCTCGCCGTGCCCTCAAGGATGG 7736
 Query 7795 AGTGGCCACAGGAGACATGCCGTATCCGGGGAAAGTGCAAAAGATCAGATGTTGGAGGA 7854
 Sbjct 7737 TGTGGCAACGGGAGCCATGCTGTGTCGGAGGAAAGTGCAAAAGTGAAGATGTTGGTGGG 7796

Query	7855	GAGAGGATATCTGCAGCCCTATGGGAAGGTTGTGACCTCGGATGTGGCAGAGGGGGCTG	7914
Sbjct	7797	GCGGGGATACCTGCAGCCCATGGAAAGGTCATTGATCTGGATGTGGCAGAGGGGGCTG	7856
Query	7915	GAGCTATTATGCCGCCACCATCCGCAAAAGTGCAGGAGGTGAGAGGATACACAAAAGGGAAG	7974
Sbjct	7857	GAGTTACTACGCCGCCACCATCCGCAAAAGTTCAGGAAGTGAAAGGATACACAAAAGGGAAG	7916
Query	7975	TCCCAGTCATGAAGAACCCATGCTGGTGCAAAAGCTATGGTGGAAACATAGTTCGTCTCAA	8034
Sbjct	7917	CCCTGGTCATGAAGAACCCGTTGGTGCAAAAGCTATGGTGGAAACATAGTCCGCTTAA	7976
Query	8035	GAGTGGAGTGGACGCTTCCACATGGCGGCTGAGCCGTTGACACTCTGCTGTGTGACAT	8094
Sbjct	7977	GAGTGGGGTGGACGCTTTTCATATGGCGGCTGAGCCGTTGACACTGTTGCTGTGTGACAT	8036
Query	8095	AGGTGAGTCATCATCTAGTCTGAAAGTGGAAAGACACGAACTCAGAGTGTCTCTAT	8154
Sbjct	8037	AGGTGAGTCATCATCTAGTCTGAAAGTGGAAAGACACGAACTCAGAGTGTCTCTCAT	8096
Query	8155	GGTGGGGGACTGGCTTGA AAAAAGACCAAGGGCCTTCTGTATAAAGGTGCTGTGCCATA	8214
Sbjct	8097	GGTGGGGGATTGGCTTGA AAAAAGACCAAGGACCTTTTGTATAAAGGTGTTGTGCCATA	8156
Query	8215	CACCAAGCACTATGATGGAACCATGGAGCGACTGCAACGTAGGATGGGGGAGGATAGT	8274
Sbjct	8157	CACCAAGCACTATGATGGAACCATGGAGCGACTGCAACGTAGGATGGGGGAGGACTGGT	8216
Query	8275	CAGAGTGCCTTGTGTGCAACTCCACACATGAGATGTACTGGGCTCTGGGGCAAGAG	8334
Sbjct	8217	CAGAGTGCCTTGTGTGCAACTCCACACATGAGATGTACTGGGCTCTGGAGCGAAAAG	8276
Query	8335	CAACATCAAAAAAGTGTGTCCACCACAAGTCAGCTCCTCTGGGAGCATGGATGGCCCC	8394
Sbjct	8277	CAACACCAAAAAAGTGTGTCCACCACGAGCCAGCTCCTCTGGGGCGCATGGACGGGCC	8336
Query	8395	CAGGAGGCCAGTGAATAATGAGGAGGATGTGAACCTCGGCTCGGGTACACGAGCTGTGGC	8454
Sbjct	8337	TAGGAGGCCAGTGAATAATGAGGAGGATGTGAATCTCGGCTCTGGCACGCGGGCTGTGGT	8396
Query	8455	AAGCTGTGCTGAGGCTCCTAACATGAAAATCATCGGCAAGGCGATTGAGAGAAATCCGCAA	8514
Sbjct	8397	AAGCTGCGCTGAAAGCTCCCAACATGAAAGTCAATTGGTAACCGCATTGAAAGGATCCGCA	8456
Query	8515	TGAACATGCAGAAAACATGGTTCTTGATGAAAACCAACCATACAGGACATGGGCTACCA	8574
Sbjct	8457	TGAGCACGCGGAAAACGTGGTTCTTGACGAGAACCAACCATATAGGACATGGGCTACCA	8516
Query	8575	TGGGAGCTACGAAAGCCCCACGCAAGGATCAGCGTCTTCCCTCGTGAACGGGGTTGTTAG	8634
Sbjct	8517	TGGAAAGCTATGAGGCCCCACACAAAGGGTCAAGCGTCTCTCTAGTAAACGGGGTTGTCA	8576
Query	8635	ACTCCTGTCAAAGCCTTGGGACGTGGTACTGGAGTTACAGGAATAGCCATGACTGACAC	8694
Sbjct	8577	GCTCCTGTCAAAGCCTTGGGATGTGGTACTGGAGTCAACAGGAATAGCCATGACCGACAC	8636
Query	8695	CACCCATACGGCCAAACAAAGAGTCTTCAAAGAAAAGTGGACACAGGGTGGCAGATCC	8754
Sbjct	8637	CACACGATAGGTCAGCAAAAGATTTCAAAGAAAAGTGGACACTAGGGTGGCAGACCC	8696
Query	8755	CCAAAGAGGCACTCGCCAGGTAATGAAACATAGTCTTCTCTGGCTGTGGAAAGGAGCTGG	8814
Sbjct	8697	CCAAAGAGGCACTCGTCAAGTTATGAGCATGAGTCTTCTCTGGTGTGGAAAGGAGCTAGG	8756
Query	8815	GAAAGCGAAGCGGCCACGCGTCTGCACCAAAAGAGGTTATCAACAAGGTCGCGAGCAA	8874
Sbjct	8757	CAAAACAAAACGGCCAGAGTCTGTACCAAAAGAGGTTATCAACAAGGTTCTGTAGCAA	8816
Query	8875	TGCAGCACTGGGAGCAATAATGAAAGGAAAAAGAAAGGAAAGACGCGCTGTGGAAAGCTGT	8934
Sbjct	8817	TGCAGCACTAGGGGCAATAATGAAAGGAAAAAGAGTGGAAAGACTGCAAGTGGAAAGCTGT	8876
Query	8935	GAATGATCCAAAGTTTGGGCCCTAGTGGATAGGGAGAGGAAACACCCTGAGAGGAGA	8994
Sbjct	8877	GAACGATCCAAAGTTCTGGGCTCTAGTGGACAAGGAAAGAGAGCACCACTGAGAGGAGA	8936
Query	8995	GTGTCAAGCTGTGTGTAACATGATGGGAAAAAGGAAAGGAAAGCAAGGAGAGTTCGG	9054
Sbjct	8937	GTGCCAGAGTTGTGTGTAACATGATGGGAAAAAGGAAAGGAAACAAAGGGAAATTTGG	8996
Query	9055	GAAAGCAAAAAGGTAGCCGCGCATCTGGTACATGTGGTTGGGAGCAGATTCTTGGAGTT	9114
Sbjct	8997	AAAGGCCAAAGGCAAGCCGCGCATCTGGTATATGTGGCTAGGGGCTAGATTCTTAGAGTT	9056
Query	9115	TGAAAGCCCTTGGATCTTGAACGAGGACCATGGATGGGAAAGGAAAACCTCAGGAGGTGG	9174
Sbjct	9057	CGAAAGCCCTTGGATCTTGAACGAGGATCACTGGATGGGGAGAGAGAACTCAGGAGGTGG	9116
Query	9175	AGTCGAAAGGTTAGGATTGCAAGGACTTGGATACATTTCAAGAGAAATGAACTGGGACCC	9234
Sbjct	9117	TGTTGAAAGGCTGGGATTACAAAGACTCGGATATGTCTAGAAAGAGATGAGTGCATACC	9176
Query	9235	AGGAGGAAAGATGTACGCAAGATGACACTGCTGGCTGGGACACCCGCATTAGTAAAGTTGA	9294
Sbjct	9177	AGGAGGAAAGATGTATGCAAGATGACACTGCTGGCTGGGACACCCGCATCAGCAGGTTTGA	9236
Query	9295	TCTGGAGAAATGAAGCTCTGATTACCAACCAATGGAGGAAAGGACACAGAACTCTGGCGT	9354
Sbjct	9237	TCTGGAGAAATGAAGCTCTAATCACCACCAAAATGGAGAAAGGACACAGGGCCTTGGCATT	9296
Query	9355	GGCCGTGATTAATACACATACCAAAAACAAAGTGGTGAAGGTTCTCAGACCAAGCTGAAAG	9414
Sbjct	9297	GGCCATAATCAAGTACACATACCAAAAACAAAGTGGTAAAGGTTCTTAGACCAAGCTGAAAA	9356
Query	9415	AGGAAAAACAGTTATGGACATCAATTCAGGACAAAGACAGAGAGGGAGTGGACAAGTTGT	9474
Sbjct	9357	AGGAAAAACAGTTATGGACATCAATTCAGGACAAAGACCAAGGGAGGACGGACAAGTTGT	9416
Query	9475	CACCTATGCTCTCAACACATTCACCAACTTGGTGGTGCAGCTTATCCGGAACATGGAAGC	9534
Sbjct	9417	CACCTACGCTCTTAACACATTTACCAACTAGTGGTGCAGCTTATCCGGAATATGGAGG	9476

Query 9535 TGAGGAAGTGTAGAGATGCAAGACTTATGGTTGTTGAGGAAGCCAGAGAAAAGTGACCAG 9594
 Sbjct 9477 TGAGGAAGTCTCGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGCCAGAGAAAAGTGACCAA 9536
 Query 9595 ATGGTTGCAGAGCAATGGATGGGATAGACTCAAACGAATGGCGGTCAGTGGAGATGACTG 9654
 Sbjct 9537 CTGGTTGCAGAGCAACGGATGGGATAGGCTCAAACGAATGGCAGTCAGTGGAGATGATTG 9596
 Query 9655 CGTTGTGAAGCCAATCGATGATAGGTTTGCACATGCCCTCAGGTTCTTGAATGACATGGG 9714
 Sbjct 9597 CGTTGTGAAGCCAATGATGATAGGTTTGCACATGCCCTCAGGTTCTTGAATGATATGGG 9656
 Query 9715 AAAAGTTAGGAAAGACACACAGGAGTGGAAACCTCGACTGGATGGAGCAATTGGGAAGA 9774
 Sbjct 9657 AAAAGTTAGGAAAGACACACAAGAGTGGAAACCTCAACTGGATGGGACAACCTGGGAAGA 9716
 Query 9775 AGTCCCGTTTCTGCTCCCACCACCTTCAACAAGCTGTACTCAAGGATGGGAGATCCATTGT 9834
 Sbjct 9717 AGTCCCGTTTCTGCTCCCACCACCTTCAACAAGCTCCATCTCAAGGACGGGAGGTCATTGT 9776
 Query 9835 GGTCCCTTGCCGCCACCAAGATGAACTGATGGCCGAGCTCGGCTCACCAGGGGCGAG 9894
 Sbjct 9777 GGTCCCTTGCCGCCACCAAGATGAACTGATGGCCGAGCTCGGCTCACCAGGGGCGAG 9836
 Query 9895 ATGGAGCATCCGGGAGACTGCCTGTCTTGCAAAATCATATGCGCAGATGTGGCAGCTCCT 9954
 Sbjct 9837 ATGGAGCATCCGGGAGACTGCCTGTCTTGCAAAATCATATGCGCAAAATGTGGCAGCTCCT 9896
 Query 9955 TTATTTCCACAGAAAGGACCTTCGACTGATGGCTAATGCCATTTGCTCGGCTGTGCCAGT 10014
 Sbjct 9897 TTATTTCCACAGAAAGGACCTTCGACTGATGGCTAATGCCATTTGCTCATCTGTGCCAGT 9956
 Query 10015 TGACTGGGTACCAACTGGGAGAACCACTGGTCAATCCATGGAAAGGGAGAAATGGATGAC 10074
 Sbjct 9957 TGACTGGGTACCAACTGGGAGAACCACTGGTCAATCCATGGAAAGGGAGAAATGGATGAC 10016
 Query 10075 CACTGAGGACATGCTCATGGTGTGGAAATAGAGTGTGGATTGAGGAGAACGACCATATGGA 10134
 Sbjct 10017 CACTGAGGACATGCTCATGGTGTGGAAATAGAGTGTGGATTGAGGAGAACGACCATATGGA 10076
 Query 10135 GGAACAAGACTCCTGTAAACAAAATGGACAGACATTCCTATCTAGGAAAAAGGGAGGACTT 10194
 Sbjct 10077 AGACAAGACCCAGTTACGAAATGGACAGACATTCCTATTTGGGAAAAAGGGAGGACTT 10136
 Query 10195 ATGGTGTGGATCCCTTATAGGGCACAGACCCCGCACCCTTGGGCTGAAAAATCAAAGA 10254
 Sbjct 10137 GTGGTGTGGATCTCTCATAGGGCACAGACCCCGCACCCTTGGGCTGAGAACATTAAGAA 10196
 Query 10255 CACAGTCAACATGGTGGCAGGATCATAGGTGATGAAAGAAAAGTACATGGACTATCTATC 10314
 Sbjct 10197 CACAGTCAACATGGTGGCAGGATCATAGGTGATGAAAGAAAAGTACATGGACTACCTATC 10256
 Query 10315 CACCAAGTCCGCTACTTGGGTGAGGAAAGGGTCCACACCCGGAGTGTGTAAAGCACCAAT 10374
 Sbjct 10257 CACCAAGTCCGCTACTTGGGTGAAAGAAAGGGTCTACACCTGGAGTGTGTAAAGCACCAAT 10316
 Query 10375 TTTAGTGTGTGAGGCTGTAGTCAAGCCACAGTTTGGGAAAAGCTGTGCAGCCTGTAAAC 10434
 Sbjct 10317 CTTAATGTTGTGAGGCTGTAGTCAAGCCACAGTTTGGGAAAAGCTGTGCAGCCTGTAAAC 10376
 Query 10435 CCCCCAGGAGAAAGCTGGGAAACCAAGCTCATAGTCAAGGCCGAGAACGCCATGGCACGGA 10494
 Sbjct 10377 CCCCCAGGAGAAAGCTGGGAAACCAAGCTCATAGTCAAGGCCGAGAACGCCATGGCACGGA 10436
 Query 10495 AGAAGCCATGCTGCCCTGTGAGCCCTCAGAGGACACTGAGTCAAAAAACCCACGCGCTT 10554
 Sbjct 10437 AGAAGCCATGCTGCCCTGTGAGCCCTCAGAGGACACTGAGTCAAAAAACCCACGCGCTT 10496
 Query 10555 GGAAGCGCAGGATGGGAAAAAGAGGTGGCGACCTTCCCCACC 10596
 Sbjct 10497 GGAAGCGCAGGATGGGAAAAAGAGGTGGCGACCTTCCCCACC 10538

ANEXO III

Uso exclusivo da CIBio:
Número de projeto / processo: 2016-25

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

1. **Título do projeto:** Exploração de compostos com atividade antiviral para inibição da infecção por ZIKV
2. **Pesquisador responsável:** Marcio Chaim Bajgelman
3. **Experimentador(es):**
Rhubia Silveira Martins
- Nível do treinamento do experimentador: |-Iniciação científica, |-mestrado, |-doutorado,
 |-doutorado direto, |-pós-doutorado, |-nível técnico, |-outro, especifique:
4. **Unidade operativa:** LNLS LNNano CTBE LNBio
5. **Maior Classe de risco de OGM deste projeto:** Risco I Risco II Risco III Risco IV
6. **O projeto é confidencial?** não sim
7. **No caso de projeto confidencial, o título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM?** não sim
8. **Qual é o objetivo do projeto?** Neste projeto verificaremos atividade antiviral para inibição de infecção por ZIKV, utilizando linhagens celulares contendo genes repórteres fluorescentes. O ZIKV não é OGM. Todas as linhagens celulares OGM serão NB1.
9. **Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador, o transgene e classe de risco do OGM.** Ex: (1) VERO-GFP: VERO, Aequoria Victoria, GFP, risco I. (2) 3T3-GFP: NIH3T3, Aequoria Victoria, GFP, risco I. Também poderemos utilizar outros fluoróforos como dsRED, YFP, mcherry, entre outros. Outras linhagens como HEK293, B16, C6, entre outras, também poderão ser utilizadas. O risco de todos os OGMs gerados é NB1.
10. **Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM:** (1) GFP: proteína fluorescente verde usada como repórter
11. **Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente?** não
12. **Algum OGM é agente patogênico esporulante?** Não Sim: _____
13. **Algum OGM é agente patogênico e pode se propagar pelo ar?** Não Sim : _____
14. **Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs?** Descreva. Não. Apesar dos OGMs serem todos NB1, trambulharemos com ZIKV parental, variantes africana (MR766) e brasileiras. Como o ZIKV é patogênico e requer cuidados NB2, os ensaios devem ser conduzidos em estrutura NB2.
15. **Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma avaliação médica periódica para experimentadores?** Não Sim. **Que tipo de avaliação?** (Ex: consulta com médico, exames laboratoriais etc...) **Qual periodicidade? Onde será realizada esta avaliação?**
16. **Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma vacinação preventiva para experimentadores?** Não Sim. **Qual periodicidade? Onde será realizada esta vacinação?** Não existe vacina.
17. **No caso de uma eventual contaminação com organismos patogênicos ou toxinas, descreva medidas emergenciais para tratamento de pessoas envolvidas, descontaminação de equipamentos, instalações e meio ambiente. Contaminação de equipamentos e superfícies de trabalho:** Deve-se descontaminar com etoh70% ou hipoclorito. **Contaminação de micropipetas:** No caso de pipetas termo pretas, pode-se autoclave-las sem desmontar. **Pipetadores automáticos:** Desmontar dentro do fluxo, descartar filtro e descontaminar partes com etoh e hipoclorito onde for aplicável. Pode-se deixar no UV por 20min. **Contaminação no avental:** descontaminar com hipoclorito ou autoclavar caso possível. **Contaminação em vestimentas próprias:**

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2016-25

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

descontaminar com EtOH e hipoclorito. Derramamento acidental na pele: Lavar com água e sabão e etoh 70%. Procurar médica do trabalho.

O pesquisador principal tem conhecimento de que conforme a RDC 50 de 21/02/2002 da Anvisa, é responsável por determinar a classificação de riscos de seu projeto, assim como determinar EPIs e medidas de segurança necessárias para prevenir a contaminação de experimentadores, equipamentos, instalações, terceiros e meio ambiente. O pesquisador responsável também precisará providenciar rotina para realização de exames médicos e laboratoriais para sua equipe, bem como vacinações quando aplicável. Todos os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados pelo pesquisador principal, que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

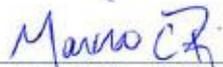
Assinatura eletrônica do pesquisador responsável:



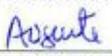
A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 5/7/2016

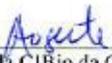
Parecer final: -projeto aprovado, -projeto recusado, -projeto com deficiências.

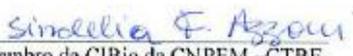
comentários da CIBio:

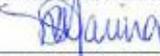

 Presidente da CIBio – CNPEM-LNBio
 Marcio Chaim Bajgelman


 Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
 Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
 Carolina Borsoi Moraes H. Freitas


 Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
 Roberto Ruller


 Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
 Sindelia Freitas Azzoni


 Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
 Marina Camata Mattos Martins Soldi

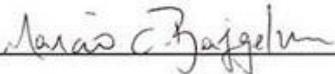
ANEXO IV

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS IN VITRO PARA PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE CITOPROTETORA OU INIBITÓRIA DO VÍRUS ZIKA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 24 de Abril de 2018

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **RHUBIA SILVEIRA MARTINS**
RG n.º **MG-16.335.054**

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **MARCIO CHAIM BAJGELMAN**
RG n.º **24492316-6**