



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

KARINA BISPO DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE INIBIDORES DE AAK1 E GAK NA INFECÇÃO PELO
VÍRUS OROPOUCHE**

**ANTIVIRAL ACTIVITY OF AAK1 AND GAK INHIBITORS IN OROPOUCHE VIRUS
INFECTION**

Campinas

2022

KARINA BISPO DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE INIBIDORES DE AAK1 E GAK NA INFECÇÃO PELO
VÍRUS OROPOUCHE**

**ANTIVIRAL ACTIVITY OF AAK1 AND GAK INHIBITORS IN OROPOUCHE VIRUS
INFECTION**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Dissertation presented to the Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Genetics and Molecular Biology, the area of Microbiology.

Supervisor/Orientador: José Luiz Proença Módena.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA KARINA BISPO DOS SANTOS E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ LUIZ PROENÇA MÓDENA.

Campinas

2022

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

B542a Bispo-dos-Santos, Karina, 1993-
Atividade antiviral de inibidores de AAK1 e GAK na infecção pelo vírus
Oropouche / Karina Bispo dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: José Luiz Proença Módena.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Agentes antivirais. 2. *Oropouche orthobunyavirus*. 3. Proteínas quinases.
4. Ciclina G. 5. Clatrina. I. Módena, José Luiz Proença, 1979-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Antiviral activity of AAK1 and GAK inhibitors in Oropouche virus infection

Palavras-chave em inglês:

Antiviral agentes

Oropouche orthobunyavirus

Protein kinases

Cyclin G

Clathrin

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Luiz Proença Módena [Orientador]

Clarice Weis Arns

Danielle Bruna Leal de Oliveira Durigon

Data de defesa: 07-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0305-367X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9105520714643876>

Campinas, 07 de dezembro de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena

Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Profa. Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira Durigon

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa (inserir o nome do programa de pós) da Unidade (inserir o nome da faculdade/instituto).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Zenilda, Antônio e ao meu companheiro Rafael por todo o amor, apoio e suporte, sem os quais esta jornada seria tão somente um sonho. Amo vocês mais que tudo! E Rafael, sua confiança em mim fez eu enxergar minha caminhada até aqui com mais respeito e orgulho, obrigada também por isso.

Ao meu orientador Dr. José Luiz Proença Módena pela oportunidade de fazer ciência, todos os preciosos ensinamentos proporcionados durante esta longa jornada e não menos importante, pela confiança depositada em mim. Aos colegas de laboratório, que, nesses anos todos, viraram grandes amigos, os quais me ensinaram não somente sobre ciência, mas sobre convivência e companheirismo, além de partilharem comigo as lutas e dores de se fazer ciência no Brasil: Mariene, Pierina, Camila, Priscilla, Aline, Daniel, Julia, Bruno, nunca me esquecerei de vocês.

Dedico também este trabalho aos parceiros científicos que tive a honra de encontrar em meu caminho, pessoas inteligentíssimas, prestativas e generosas ao compartilhar seu tempo, conhecimento e experiência de vida para amadurecer meu espírito científico e enriquecer o presente trabalho, além de me acalentarem com palavras de apoio nos momentos difíceis: profa. Dra. Fabiana Granja, profa. Dra. Clarice Arns, prof. Dr. Rafael Elias, Luiz Salvino, Alexandre Borin, Laís Durço, Natália Brunetti, Guilherme Milanez, Ana Lúcia, Ana Paula Moraes, Matheus Martini, Gabriela, Stefanie e tantos outros que caminharam ao meu lado nessa jornada.

Dedico este trabalho a todos que apoiam a ciência e os cientistas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado graças à concessão de bolsa de estudos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo 2020/02159-0 com vigência de 01/08/2020 à 31/05/2022. Também contou com apoio FAPESP processo 2016/00194-8.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo: 88887.479553/2020-00 com vigência de 01/03/2020 a 31/07/2020.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, ao Instituto de Biologia da Unicamp, ao Laboratório de Estudo de Vírus Emergentes – LEVE e seus laboratórios parceiros (Laboratório de Virologia Animal, Laboratório de Manipulação de Patógenos, Laboratório Multidisciplinar em Alimentos e Saúde, entre outros).

Muito obrigada aos familiares, amigos, companheiros de trabalho e professores que me acompanharam nessa jornada.

“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível

Que o céu é o limite e você, truta, é imbatível

Que o tempo ruim vai passar, é só uma fase

Que o sofrimento alimenta mais a sua coragem [...]

A vida não é o problema, é batalha, desafio

Cada obstáculo é uma lição, eu anuncio

... É isso aí você não pode parar”

A Vida é Desafio – Racionais MC's

RESUMO

As doenças infecciosas ocupam a quarta principal causa de morte e de incapacitância no mundo, caracterizando-se como uma séria ameaça à saúde pública e à economia global. No Brasil, apesar das várias epidemias arbovirais que emergiram nos últimos anos, casos de doença febril associados ao arbovírus Oropouche Orthobunyavirus (OROV) continuam a acontecer, principalmente na região Amazônica. A entrada de OROV em células hospedeiras é dependente da endocitose mediada por clatrina (EMC), um processo altamente orquestrado e que envolve a atividade da quinase 1 associada à proteína adaptadora 2 (AAK1) e da quinase associada à ciclina G (GAK). Até o momento, não há tratamento aprovado para o combate da febre do Oropouche e, uma das dificuldades encontradas trata-se da alta diversidade genética entre ortobunyavírus, o que torna desafiador o desenvolvimento de compostos com atividade antiviral direta. Dado esse contexto, o foco desse trabalho foi avaliar o efeito antiviral contra OROV de compostos com atuação direcionada às estruturas do hospedeiro, principalmente inibidores de AAK1 e GAK em células Vero infectadas. Dos sete compostos analisados, seis apresentaram atividade antiviral. Os melhores resultados foram obtidos com o inibidor de ambas as quinases, AAK1 e GAK, nas condições de pré-tratamento e nos períodos de 0h e 2h após o tempo de adsorção. O LP935509, composto comercial com atividade inibitória de AAK1 e GAK apresentou $IC_{50} = 13,20 \mu M$, enquanto os compostos SGC-GAK-N, SGC-AAK1-1 e SGC-AAK1-N apresentaram IC_{50} de 90,58, 104,60 e 403 μM respectivamente. A cloroquina inibiu OROV somente em altas concentrações, com um IC_{50} de 4.611 μM , SGC-GAK-1 inibiu $1 \log_{10}$ de OROV a 2,5 μM e a ribavirina não apresentou atividade antiviral nas concentrações testadas. Desse modo, acreditamos que nossos resultados ilustram o papel de AAK1 e GAK, da endocitose mediada por clatrina e da acidificação endossomal para a internalização de OROV.

Palavras-chave: antiviral, Oropouche, AAK1, GAK, endocitose mediada por clatrina.

ABSTRACT

Infectious diseases are the fourth leading cause of death and disability in the world, characterizing as a serious threat to public health and global economy. In Brazil, despite the several arboviral epidemics that have emerged in recent years, cases of febrile illness associated with the arbovirus Oropouche Orthobunyavirus (OROV) continue to occur, mainly in the Amazon region. OROV entry into host cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis (CME), a highly orchestrated process involving the activity of adapter protein-associated kinase 1 (AAK1) and cyclin-associated kinase G (GAK). So far, there is no approved treatment to combat Oropouche fever, and one of the difficulties encountered is the high genetic diversity among orthobunyaviruses, which makes the development of compounds with direct antiviral activity challenging. Given this context, the focus of this research was to evaluate the antiviral effect against OROV of compounds with host-targeted action, mainly AAK1 and GAK inhibitors in infected Vero cells. Seven compounds were analyzed and six showed antiviral activity. The best results were obtained with the inhibitor of both kinases, AAK1 and GAK, in the pre-treatment conditions and in the periods of 0h and 2h after the adsorption time. LP935509, a commercial compound with inhibitory activity on AAK1 and GAK, presented $IC_{50} = 13.20 \mu M$, while the compounds SGC-GAK-N, SGC-AAK1-1 and SGC-AAK1-N presented IC_{50} of 90.58, 104.60 and 403 μM respectively. Chloroquine inhibited OROV only at high concentrations, with an IC_{50} of 4,611 μM , SGC-GAK-1 inhibited $1 \log_{10}$ of OROV at 2.5 μM , and ribavirin showed no antiviral activity at the concentrations tested. Thus, we believe that our results illustrate the role of AAK1 and GAK, clathrin-mediated endocytosis, and endosomal acidification for OROV internalization.

Keywords: antiviral, Oropouche, AAK1, GAK, clathrin-mediated endocytosis.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	12
CAPÍTULO I: Vírus emergentes	12
1.1 Doenças infecciosas emergentes.....	12
1.2 Arbovírus.....	13
CAPÍTULO II: Oropouche Orthobunyavirus	15
1.3 Aspectos gerais do Oropouche Orthobunyavirus	15
1.4 Endocitose mediada por clatrina e sua subversão nas infecções virais.....	18
1.5 Investigação de AAK1 e GAK como alvos antivirais de amplo espectro.....	21
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Vírus	25
3.2 Células	25
3.3 Compostos.....	25
3.4 Titulação OROV	26
3.5 Avaliação da viabilidade celular em Vero dos compostos	26
3.6 Concentração Citotóxica de 50% dos compostos (CC ₅₀).....	27
3.7 Ensaio atividade virucida contra OROV	27
3.8 Ensaio de concentração inibitória de 50% (IC ₅₀)	27
3.9 Índice de Seletividade (IS)	28
3.10 Ensaio de atividade antiviral contra OROV.....	28
3.11 Ensaio de tempo de adição	28
3.12 Extração de RNA	29
3.13 qRT-PCR	29
3.14 Análise dos dados e estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Citotoxicidade dos compostos.....	30
4.2 Concentração citotóxica de 50% dos compostos (CC ₅₀)	31
4.3 Atividade virucida contra OROV.....	33
4.4 Concentração inibitória (IC ₅₀) inibidores de quinases	34
4.5 Concentração inibitória (IC ₅₀) cloroquina e ribavirina.....	37
4.6 Índice de Seletividade (IS) dos compostos.....	39

4.7	Avaliação do ensaio de tempo-de-adição.....	41
5.	CONCLUSÕES.....	44
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
7.	APÊNDICE 1 – Declarações éticas e autorais	55

1. INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I: Vírus emergentes

1.1 Doenças infecciosas emergentes

Doenças emergentes podem ser definidas como aquelas que surgiram recentemente em uma população ou que, uma vez existentes, tiveram aumento em sua incidência ou em expansão geográfica. Dentro dessa definição, as doenças infecciosas ocupam a quarta principal causa de morte e de incapacitação no mundo, segundo estimativa de 2019 da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2019). Esse número pode aumentar substancialmente, à medida que doenças anteriormente consideradas crônicas são reclassificadas como infecciosas, como o câncer de colo de útero causado pelo papilomavírus humano (HPV) e o carcinoma hepatocelular causado pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV) (Morens et al., Ringelhan et al., 2018).

As doenças infecciosas emergentes (EIDs) são um grande desafio enfrentado pela humanidade desde sempre. Há vários registros históricos de “pestes” e “pragas” que surgiram no Antigo Testamento, na China Antiga, Grécia e Roma clássicas. Alguns estudos disponíveis tentam analisar os fatores que impulsionam o surgimento de EIDs, com o objetivo não só de compreender melhor esse fenômeno, como também identificar e monitorar situações de alerta, além de criar intervenções para a prevenção e respostas que sejam eficientes. Os estudos de (Morens et al., 2008) e (Jones et al., 2008) verificam que o surgimento das EIDs é expressivamente correlacionado a fatores socioeconômicos, políticos, ambientais e ecológicos. Neles observa-se que há determinantes básicos, mais relacionados à natureza cíclica de fatores ambientais e ecológicos, assim como os determinantes relacionados ao movimento humano – este último agravado constantemente pela maior complexidade da existência humana moderna, o que inclui alterações climáticas e modificações ambientais.

A classificação das EIDs em “recém-emergentes”, “reemergentes” e “deliberadamente emergentes” é importante para destacar as diferentes causas e estratégias de prevenção e controle que elas demandam. As infecções recém-emergentes, por exemplo, são as não-reconhecidas anteriormente no homem e

possuem várias causas possíveis: mutações e rearranjos genéticos de microrganismos, mudanças nas populações hospedeira e de reservatório e o movimento humano (globalização e urbanização). Infecções reemergentes são as quais se observa um aumento na incidência em humanos ou na faixa geográfica atingida (Morens et al., 2004). Elas compartilham de todos os fatores que causam as infecções “recém-emergentes” somado a fatores ambientais, como o já bem documentado aumento das infecções transmitidas por vetores e por alimentos nos meses mais quentes do ano (World Health Organization, 2003). A última categoria, “infecções deliberadamente emergentes” são aquelas desenvolvidas pela ação direta do homem, como as infecções causadas por antraz nos Estados Unidos da América (USA) após ataque terrorista em 2001 (Jernigan et al., 2002), ou microrganismos resultantes de bioengenharia que podem possuir modificações que aumentem a virulência do patógeno alvo (Morens et al., 2004).

Dentre as EIDs recém e re-emergentes de grande impacto, os arbovírus têm papel de destaque. Nas últimas décadas, grandes epidemias virais foram causadas por vírus pertencentes a esse grupo, incluindo dengue (DENV); febre amarela (YFV); chikungunya (CHIKV); encefalite japonesa (JEV) entre outros (Gubler, 2002), além da pandemia de zika (ZIKV). O fato de sua origem ou transmissão estarem relacionadas ao envolvimento de vetores, mudanças ambientais e movimento humano e agrícola somados à dificuldade na identificação, rastreamento e contenção a níveis regionais e globais representam uma grande ameaça à saúde pública mundial.

1.2 Arbovírus

Os arbovírus são vírus que para serem transmitidos a um vertebrado, necessitam de um vetor artrópode hematófago, num ciclo de transmissão que envolve uma variedade de hospedeiros reservatórios suscetíveis. O ser humano, na maioria das vezes se torna um hospedeiro ocasional ao entrar em ambientes silvestres, ou pela conversão desses locais em ecossistemas agrícolas ou urbanos. Esse fenômeno pode incluir a adaptação do vírus a mais hospedeiros, como os animais de criação e/ou domésticos, que se tornam outra fonte de transmissão aos humanos (Weaver, 2005). A adaptação da transmissão entre humanos também é possível, como no caso do vírus da dengue, que se mantém em circulação urbana

num ciclo de transmissão homem-mosquito-homem sem a necessidade de um reservatório animal. A distribuição dos arbovírus é global, porém é mais comum em regiões tropicais e subtropicais, onde a transmissão pode ocorrer durante todo o ano devido a condições climáticas que influenciam na abundância dos vetores. (Gubler, 2002). A ecologia das arboviroses é multifatorial e influenciada pelas mudanças no meio ambiente, na população de reservatórios e vetores e pelo comportamento humano: expansão da população e do fluxo de humanos, mercadorias e atividade pecuária, além da rápida mudança climática, degradação ambiental, ocupação desordenada de áreas periurbanas e o desmatamento (Lorenz et al., 2017; Smith, 2018).

A maioria dos arbovírus de importância para a saúde pública pertencem a três diferentes famílias: *Flaviviridae*; *Togaviridae* e *Peribunyaviridae* (Huang et al., 2019; Liang et al., 2015) e causam uma doença febril aguda indiferenciada. Como exemplo da família *Flaviviridae*, o vírus da dengue causa uma infecção tida por alguns autores como a arbovirose mais comum em todo o mundo (Bhatt et al., 2013; Ushijima et al., 2021). Já o vírus zika, outro exemplar da família, atraiu atenção global desde a grande epidemia de 2015 e suas complicações congênitas. O vírus do Nilo Ocidental (WNV), arbovírus neurotrópico antes limitado à África, nos dias atuais é endêmico na América do Norte, parte da Europa e vem expandindo-se na América do Sul (Fischer et al., 2021). Entre os exemplares da família *Togaviridae*, o vírus chikungunya é o mais conhecido, particularmente como reflexo da sua grande abrangência mundial e da doença altamente debilitante que ele causa. Os vírus da encefalite equina Venezuelana (VEEV) e Mayaro (MAYV) são outros membros dessa família que circulam nas Américas do Sul e Central e podem levar a doenças neurológicas e artríticas em humanos. Por fim, entre os membros da família *Peribunyaviridae*, podemos destacar o Oropouche Orthobunyavirus (OROV). Ele é distribuído por toda região Amazônica, mas tem sido notificado em localidades cada vez mais distantes da sua origem, como nos estados da Bahia e Minas Gerais (dos Santos Fonseca et al., 2019; Fischer et al., 2021; Nunes et al., 2019).

Apesar de eventualmente apresentarem uma taxa de mortalidade baixa e serem geralmente autolimitadas, as arboviroses podem estar associadas com quadros clínicos graves em uma parcela das pessoas infectadas, causando manifestações hemorrágicas (DENV, YFV), má formações fetais (ZIKV), doenças neurológicas (WNV, VEEV, OROV) e artrite crônica (CHIKV, MAYV). Com exceção

da febre amarela, dengue e encefalite japonesa, não há vacina disponível para humanos para essas doenças e o tratamento é limitado à sua sintomatologia (Carvalho & Long, 2021). Por isso, outras formas de controle são necessárias e devem ser direcionadas à uma política de vigilância humana e animal proativa nos ambientes agrícolas, periurbanos e urbanos. Essa iniciativa está ligada à criação e implementação de métodos diagnósticos, o emprego de profissionais capacitados nas unidades de saúde e de um protocolo de investigação sólido e simplificado. Desenvolver políticas públicas de educação dos cidadãos para a prevenção de vetores; explorar alternativas de combate aos vetores; discutir as ações de intervenção em áreas florestais e estimular o desenvolvimento de programas de pesquisa para melhor compreender os mecanismos de surgimento, dispersão e patogenicidade dos arbovírus são medidas fundamentais no combate e prevenção dessas doenças (Carvalho & Long, 2021; Gibb et al., 2020).

CAPÍTULO II: Oropouche Orthobunyavirus

1.3 Aspectos gerais do Oropouche Orthobunyavirus

O Oropouche Orthobunyavirus é um arbovírus membro do gênero *Orthobunyavirus* e da família *Peribunyaviridae*. É constituído de um envelope lipídico adquirido do hospedeiro, onde ficam as glicoproteínas de superfície Gc e Gn. Seu genoma consiste em fitas simples de RNA de polaridade negativa, tripartido nos segmentos L (*large*), M (*medium*) e S (*small*), envoltos por um nucleocapsídeo helicoidal associado à uma RNA polimerase RNA dependente (RdRp). É o agente etiológico da Febre do Oropouche (Proenca-Modena et al., 2016), uma doença febril aguda frequente no norte do Brasil e em outras regiões Amazônicas, somando mais de 30 surtos relatados na América central e sul. De fato, estima-se que a febre do OROV tenha afetado mais de meio milhão de pessoas desde os anos 50 somente no Brasil, fazendo dele um dos arbovírus mais frequentes no nosso país (Lorenz et al., 2017; Sakkas et al., 2018). O vírus OROV é transmitido principalmente por mosquitos da espécie *Culicoides paraensis* (ou maruim, nome popular) e por *Culex quinquefasciatus* em ambientes urbanos. Em ambiente rural e silvestre, OROV já foi isolado a partir das espécies *Aedes serratus* e *Coquilletidia venezuelensis* (DA ROSA, 1989). A transmissão de OROV em ambiente silvestre envolve diferentes

hospedeiros vertebrados, como marsupiais, preguiças, primatas e aves, enquanto em ambiente urbano o ser humano é tido como hospedeiro principal (da Rosa et al., 2017).

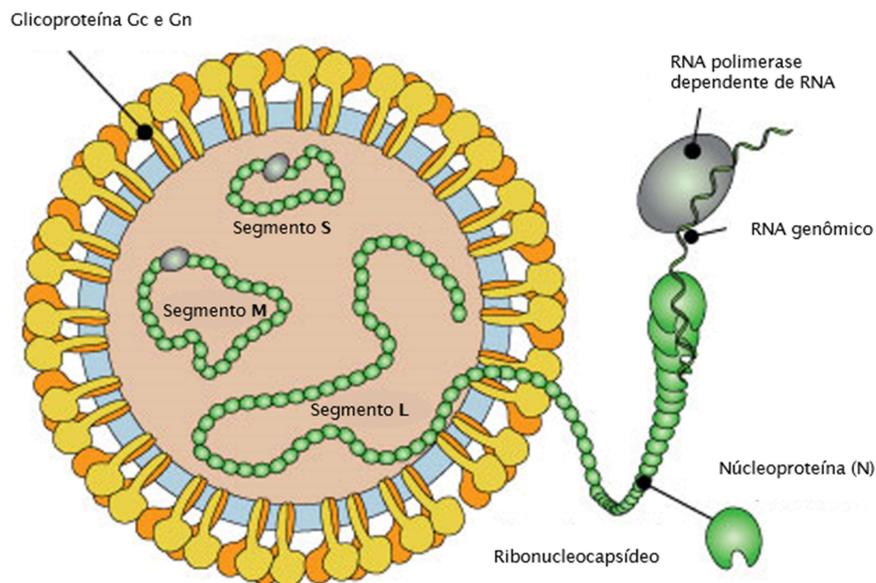


Figura 1. Vírion de Orthobunyavirus. Genoma linear de RNA de fita negativa segmentado, segmento L mede cerca de 6,9 kb, segmento M cerca de 4,5 kb e segmento S cerca de 1 kb. Adaptado de ViralZone.

A febre do OROV é uma doença caracterizada pela presença de febre, calafrios, mal-estar, mialgia difusa, poliúria, artralgia, dor lombar, cefaleia, náuseas, fotofobia e esporadicamente, erupções cutâneas (de Souza Luna et al., 2017). Aproximadamente 50% dos pacientes apresentam quadros de recidivas uma semana após o fim dos sintomas, assim como fraqueza e perda de força física são ocasionalmente relatadas no período de 2 a 4 semanas após a infecção. Em concordância com isso, OROV pode ser considerado um vírus neurotrópico. A infecção *ex vivo* por OROV em fatias cerebrais humanas leva à produção de partículas virais infecciosas e à dano tecidual (Almeida et al., 2021). A evolução dos sintomas para meningite e/ou encefalite ocorre em uma parte dos pacientes infectados, incluindo crianças, pacientes com ruptura prévia da barreira hematoencefálica e imunocomprometidos (da Rosa et al., 2017). As manifestações neurológicas são registradas principalmente durante grandes surtos (Sakkas et al., 2018), porém, como não há protocolo pré-estabelecido para o diagnóstico de doença neurológica causada pela infecção de OROV, a associação desses sintomas à febre

do Oropouche muitas vezes fica restringida à experiência prévia do profissional de saúde atuante (Chiang et al., 2021).

OROV é um vírus com alta taxa de variação na natureza, em parte devido a alta frequência de mutações e aos rearranjos genômicos com outros *Orthobunyavirus*, como consequência de reassortimento dos segmentos genômicos durante eventos de co-infecção (Figueiredo, 2007). Esse fenômeno está relacionado com a geração de variantes mais patogênicas e ao aumento da chance de transmissão por outros vetores invertebrados (Sakkas et al., 2018). Os vírus Iquitos, Madre de Dios e Perdões – este último isolado de um primata não humano em Minas Gerais – possuem RNA do segmento S e L de OROV (da Rosa et al., 2017). Um estudo recente demonstrou que, uma vez infectado laboratorialmente, o mosquito *Aedes aegypti* foi capaz de transmitir OROV a camundongos imunocomprometidos (de Mendonça et al., 2021). Outro agravante vem do fato de que OROV não é sistematicamente procurado pelos órgãos de vigilância do nosso país, gerando subnotificação dos casos. Esses achados demonstram o risco do surgimento de ciclos urbanos permanentes e da expansão geográfica de OROV, e consequentemente um potencial problema de saúde pública nas regiões mais populosas do Brasil nos próximos anos (Portal da Agência Fapesp, 2017).

Tendo em vista a importância e iminência de uma epidemia de OROV no Brasil, faz-se necessário o estudo de medidas profiláticas e de tratamento da febre do Oropouche. Uma abordagem de imunoinformática com o objetivo de procurar por alvos vacinais identificou vinte e três epítomos da poliproteína de OROV reconhecíveis pelas células T CD8⁺ e B, que foram considerados bons candidatos para uma futura vacina baseada em epítomos (Adhikari et al., 2018). Recentemente, a vacinação com uma quimera de vírus da estomatite vesicular (VSV) expressando as glicoproteínas Gc de OROV demonstrou reduzir a carga viral de camundongos desafiados com o vírus do tipo selvagem (Stubbs et al., 2021). Esses estudos demonstram um avanço nas estratégias de prevenção da febre do Oropouche, porém até o momento, nenhuma vacina foi aprovada ou mesmo chegou a testes clínicos em humanos. O mesmo ocorre no âmbito das terapias antivirais contra essa doença, alguns antivirais e antitumorais comerciais já foram testados *in vitro*, mas não há tratamento antiviral aprovado.

Deste modo, a estratégia de combate a essa doença se limita à medidas de controle e erradicação dos vetores. Dadas as características genômicas do vírus,

direcionar os estudos de antivirais para análise de alvos na célula hospedeira pode oferecer soluções de amplo espectro neste campo. Há na literatura poucos registros sobre os mecanismos de interação do OROV nas células hospedeiras, destacando-se o estudo de (Santos et al., 2008) que demonstra que a entrada de OROV em células HeLa é associada com a formação de vesículas recobertas de clatrina e requer acidificação endossomal. Entender melhor esta via de entrada pode contribuir na investigação de compostos com potencial ação antiviral durante as etapas iniciais do processo replicativo de OROV em células hospedeiras.

1.4 *Endocitose mediada por clatrina e sua subversão nas infecções virais*

A clatrina é a principal estrutura molecular nos processos de organização das membranas celulares e de transporte de componentes de um compartimento de bicamada lipídica para outro. Pode ser definida como um andaime molecular para captação vesicular de carga na membrana plasmática, formando um revestimento tipo treliça nas membranas e em torno delas (Kirchhausen et al., 2014). As vesículas revestidas de clatrina (CCVs) são responsáveis pela endocitose mediada por receptor na membrana plasmática (Figura 2) e triagem de proteínas na rede trans-Golgi (TGN) durante a biogênese de lisossomos e grânulos secretores. Por isso, as CCVs desempenham um papel crítico em diversas infecções virais (Mudhakar & Harashima, 2009; Rust et al., 2004).

A endocitose mediada por clatrina (CME) é utilizada para a entrada de diferentes vírus, como o do Nilo Ocidental (Chu & Ng, 2004), dengue, zika (I. Lee et al., 2018), rinovírus, influenza A, entre outros. De maneira geral, a CME dos vírus é um processo rápido. Após se ligarem aos receptores celulares alvo, aproveitam-se das atividades endocíticas contínuas ou induzem sua captação ativando vias de transdução de sinalização celular, o que ocorre em poucos minutos. Uma vez internalizados, são entregues aos endossomos para prosseguir com o processo de desnudamento e liberação de seus componentes dentro da célula hospedeira (Mercer et al., 2010).

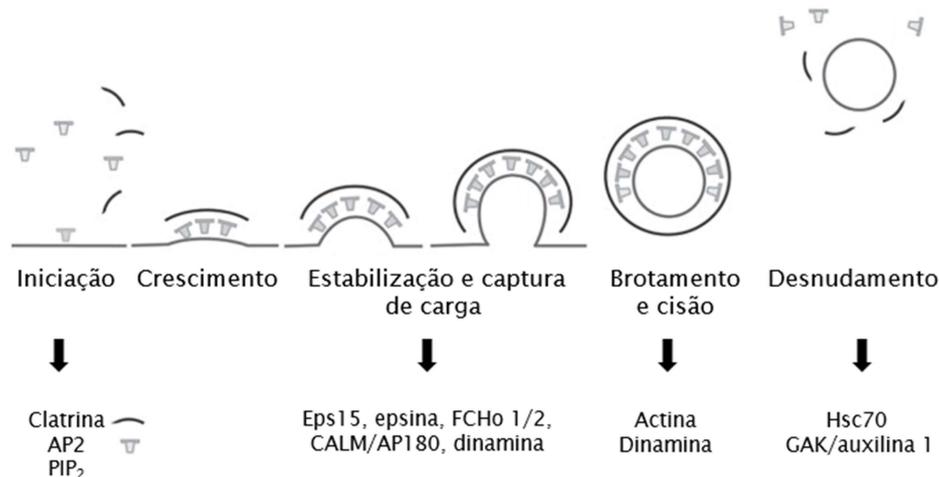


Figura 2. Esquema da CME. Os complexos de adaptadores AP2, associados à membrana com (PIP₂), recrutam triskelions de clatrina para iniciar a montagem da rede. O crescimento estável e o fechamento da rede requerem proteínas acessórias endocíticas (Eps15, epsina, FCHO1/2, CALM/AP180). Dinamina é auxiliada pela polimerização de actina quando a membrana está sob tensão, conduz a cisão da membrana e a liberação da vesícula revestida. O Hsc70 é recrutado pela proteína GAK e medeia o desencapsulamento da clatrina e a liberação de uma vesícula livre. O texto abaixo do diagrama indica os estágios nos quais vários componentes celulares atuam. Adaptado de (Kirchhausen et al., 2014).

Durante o desenvolvimento das CCVs, a formação da rede de clatrina é nucleada nas membranas celulares por adaptadores heterotetraméricos AP1 e AP2, que são atraídos para a rede e acionam a formação de CCVs na membrana plasmática (Kaksonen & Roux, 2018). Estes adaptadores ligam o revestimento de clatrina e a bicamada de membrana e são as principais moléculas de reconhecimento de carga (Kirchhausen et al., 2014). O adaptador heterotetramérico AP2 é o principal tipo associado ao tráfego na membrana plasmática e, portanto, à CME, ligando-se à clatrina, moléculas de carga, proteínas acessórias e membranas (Kadlecova et al., 2017). É constituído de duas subunidades maiores (α - alfa, β - beta), uma média (μ - mi) e uma pequena (σ - sigma) (Figura 3). A primeira etapa de ativação de AP2 é seu recrutamento para a membrana plasmática, seguido da abertura de sua conformação devido atração eletrostática e por fim, sua estabilização através da fosforilação da subunidade μ pela quinase 1 associada ao AP2 (AAK1) (Conner & Schmid, 2002).

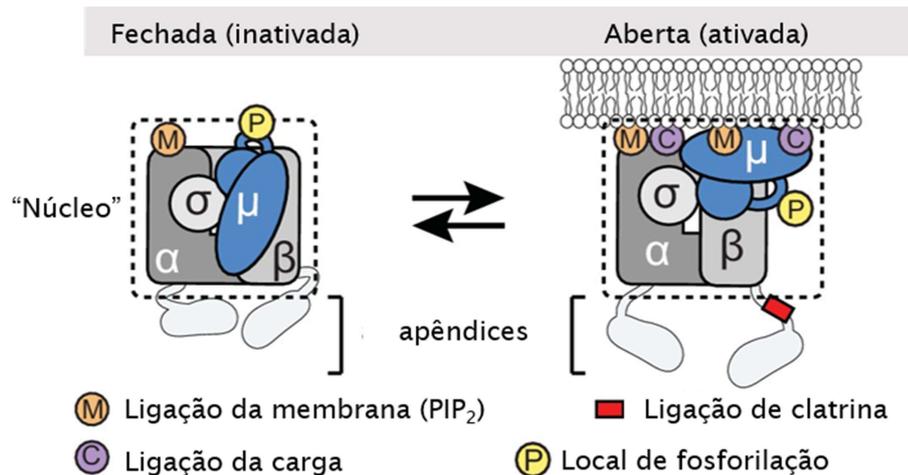


Figura 3. Complexo de AP2. Compreende quatro subunidades e um 'núcleo' estruturado (caixa tracejada) conectado por ligantes flexíveis a apêndices nas subunidades alfa e beta. Os locais de ligação para substratos AP2 são indicados. Adaptado de (Partlow et al., 2019).

A AAK1 é um membro da família de quinase associada à Numb (NAK) que regula a endocitose fosforilando vários componentes acessórios endocíticos. No caso de AP2, fosforila a subunidade μ_2 , que se liga diretamente a motivos de internalização baseados em tirosina encontrados na cauda citoplasmática de alguns receptores (Conner & Schmid, 2002). A atividade da AAK1 em relação à μ é dramaticamente estimulada pela clatrina montada (Conner et al., 2003), sugerindo que AAK1 é ativada especificamente em poços revestidos com clatrina para melhorar a captação de carga.

Outra quinase da família NAK essencial para o processo de CME é a quinase associada à ciclina G (GAK), também chamada de auxilina 2 (Lee et al., 2006). Ela é um cofator essencial para o desnudamento de CCVs dependente da chaperona cognata de choque térmico (Hsc70), ligando-se à ela através do domínio do tipo J e à membrana plasmática pelo domínio do tipo EPTEN. A auxilina 1 (expressa majoritariamente em neurônios) e a GAK aparecem nas CCVs em sucessivas explosões transitórias, imediatamente após a liberação da vesícula, que ocorre com a cisão da membrana plasmática, mediada por dinamina (He et al., 2020; Lee et al., 2006). Partindo desse conhecimento, nosso alvo de estudo para avaliação de atividade antiviral são os componentes da endocitose mediada por clatrina e da atividade lisossomal.

1.5 Investigação de AAK1 e GAK como alvos antivirais de amplo espectro

Corroborando com o conhecimento da importância de AAK1 e GAK na CME e da subversão dessa via nas infecções virais, vários trabalhos nos últimos anos estudaram diferentes etapas do ciclo replicativo viral tendo essas quinases hospedeiras como alvo (Figura 4). Já foi demonstrado que AAK1 e GAK atuam em dois estágios diferentes do ciclo replicativo dos vírus da hepatite C, sendo na entrada e na montagem da partícula viral e, uma vez inibidas quimicamente, diminuem a replicação de HCV *in vitro* (Neveu et al., 2012, 2015; Xiao et al., 2018). A inibição de ambas também foi testada durante a infecção por dengue e ebola (EBOV) de modelos murinos e demonstrou proteção contra morbidade e mortalidade (Bekerman et al., 2017; Pu, Xiao, et al., 2018).

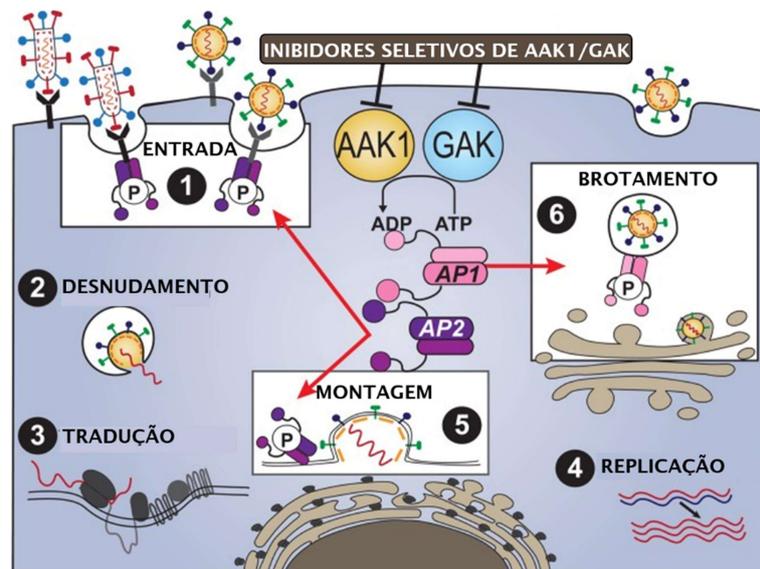


Figura 4. AAK1 e GAK na infecção e como alvos antivirais de amplo espectro. Os vírus entram nas células por diferentes mecanismos de entrada (1), em seguida ocorre o desnudamento, onde o material genético é liberado da partícula viral e fica exposto no interior da célula hospedeira. Em seguida, começa a tradução (3) das proteínas virais e a replicação do material genético (4) utilizando-se de estruturas celulares. A próxima etapa consiste na montagem (5) da partícula viral e modificações estruturais para tornar a partícula madura (pronta para infectar) e por fim, a liberação da nova partícula viral para fora da célula. As quinases hospedeiras AAK1 e GAK regulam a entrada (1), montagem (5) e/ou liberação (6) de múltiplos vírus de RNA através da fosforilação dos adaptadores de tráfego de membrana AP1 (rosa) e AP2 (roxo). Inibidores seletivos de AAK1 e GAK interrompem essas etapas temporalmente distintas do ciclo replicativo viral e atuam como antivirais de amplo espectro. Adaptado de (Bekerman et al., 2017).

Estudada separadamente, AAK1 foi apontada como um dos componentes chave do processo de endocitose do vírus da raiva (RABV), num estudo utilizando RNA de interferência (Wang et al., 2020), enquanto (Verdonck et al., 2019) sintetizaram um composto com alta afinidade por AAK1 que demonstrou atividade inibitória contra o vírus da dengue *in vitro*. GAK também foi alvo de estudo de (Wouters et al., 2019) e (Pu et al., 2018) ao sintetizarem inibidores otimizados de GAK que demonstraram eficácia nos testes contra o vírus da dengue *in vitro*. (Kovackova et al., 2015) relataram a inibição de HCV em duas etapas distintas do ciclo replicativo do vírus com um inibidor de GAK.

Esses dados corroboram a relevância da investigação de AAK1 e GAK como alvo antiviral contra a infecção pelo vírus Oropouche. Além dos compostos inibidores das duas quinases, incluímos como controle no estudo os compostos cloroquina e ribavirina.

A cloroquina é uma quinolona que se acumula nos lisossomos e outros compartimentos ácidos intracelulares, aumentando o pH dessas estruturas, podendo prejudicar a replicação viral de vírus com entrada mediada por endossomo ou nos estágios finais de replicação de vírus envelopados, além de reduzir a modificação pós-transcricional de proteínas e a reciclagem de receptores (Savarino et al., 2003). A cloroquina já demonstrou diminuir a carga viral dos vírus da dengue tipo 2 e do coronavírus humano cepa OC43 (HCoV-OC43) (Farias et al., 2015; Keyaerts et al., 2009), portanto acreditamos que os dados obtidos a partir da sua atividade frente OROV irá contribuir para o melhor entendimento da infecção, sendo uma alternativa de tratamento de um medicamento com uso já aprovado em humanos.

A ribavirina, por sua vez, é um análogo de nucleotídeo que, uma vez ativado por enzimas metabólicas de purina ou pirimidina hospedeira podem inibir a replicação viral. Estudos demonstram que as formas metabolizadas de ribavirina podem interagir com várias RNA polimerases virais além de induzir mutagênese viral, embora o exato mecanismo de ação ainda precise ser elucidado (Paeshuyse et al., 2011; Parker, 2005). Por fim, a ribavirina é amplamente utilizada no tratamento de pacientes infectados com hepatite C, além de utilizada no tratamento de pacientes internados devido infecções causadas pelo vírus sincicial respiratório e pelo vírus Lassa (McCormick et al., 1986; Randolph & Wang, 1996; Smith et al., 1991). Devido sua atuação frente a vários vírus, incluímos a análise da atividade

antiviral da ribavirina como um antiviral de amplo espectro que pode contribuir no tratamento da febre do Oropouche.

2. OBJETIVOS

O presente estudo busca avaliar a atividade antiviral de compostos direcionados ao processo de endocitose mediada por clatrina do hospedeiro frente à infecção pelo vírus Oropouche *in vitro* em células Vero.

2.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar a citotoxicidade dos compostos selecionados na linhagem celular Vero.
2. Verificar a diminuição da infecção por Oropouche frente os compostos alvo por ensaios de inibição *in vitro*.
3. Calcular o valor de IC_{50} , CC_{50} e o índice de seletividade (IS) dos compostos que demonstrarem atividade antiviral.
4. Caracterizar o efeito dos antivirais em diferentes etapas do ciclo replicativo de OROV pelo ensaio de tempo de adição.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vírus

Neste projeto foi utilizado o vírus Oropouche da linhagem BeAn 19991 que foi cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (FMRP-USP). O estoque viral de OROV foi obtido após pelo menos 3 passagens sucessivas em células Vero CCL81 realizadas no nosso Laboratório. As coletas foram feitas após 36 h ou após apresentar 80% de efeito citopático. O estoque viral foi titulado por ensaio de formação de foco infeccioso conforme descrito posteriormente (3.4). O estoque viral utilizado em todo o estudo tinha uma concentração de 2×10^6 FFU/mL e foi armazenado em alíquotas com não mais de 1 mL em criotubos à -80°C .

3.2 Células

Este estudo foi realizado utilizando as linhagens celulares estabelecidas Vero E6 (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*, ATCC[®] No. CRL-1586) e Vero CCL81 (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*, ATCC[®] No. CRL-1587). As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco[™]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife[®]) e 1% de penicilina/estreptomicina 10.000 U/mL (Gibco[™]) seguindo instruções da ATCC em incubadora a 37°C com 5% de CO_2 .

3.3 Compostos

Os compostos testados foram i) LP935509 (Axon Medchem[®]), um inibidor comercial das quinases AAK1 e GAK. Os quatro compostos seguintes foram sintetizados e cedidos pelo Structural Genomics Consortium/CQMED da UNICAMP: ii) SGC-AAK1-1, composto inibidor da quinase AAK1; iii) SGC-AAK1-N, um composto inibidor de quinases que não atua em AAK1; iv) SGC-GAK, composto inibidor da quinase GAK; v) SGC-GAK-N, um composto inibidor de quinases que não atua em GAK. vi) cloroquina (Tocris Bioscience[™]), uma 4-aminoquinolina que interfere na atividade lisossomal e na autofagia através do aumento do pH dessas vesículas e vii) ribavirina (Sigma-Aldrich[®]), uma análoga à guanósina, inibidora da replicação de alguns RNA e DNA virais. Os estoques foram feitos na concentração

de 10 mM e armazenados à -20°C. Com exceção da cloroquina, que foi ressuspensa em água, todos os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Para os ensaios *in vitro*, as diluições dos estoques foram realizadas em meio DMEM.

3.4 Titulação OROV

A quantidade de vírus viável de OROV foi determinada por ensaio de formação de foco infeccioso. Os vírus expandidos e o sobrenadante dos ensaios celulares foram inoculados após diluição seriada decimal em monocamadas de células Vero E6, crescidas em placas de 96 poços, em triplicata. Após 1h de adsorção, foi acrescido meio semissólido (0,75% carboximetilcelulose [CMC] [Sigma-Aldrich®] em DMEM 2x [Gibco™], 5% SFB, 1% penicilina/estreptomicina) e incubado por 40h, quando foi fixado com paraformaldeído 1%. A leitura do experimento foi realizada pela presença de focos azuis após marcação com anticorpo primário policlonal anti-OROV (Absolute antibodies: cat. no Ab00230-23.0) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich®) seguido de revelação com o substrato para peroxidase Trypan-Blue (Sigma-Aldrich®). Os resultados foram obtidos conforme equação 1 e expressos como unidades formadoras de foco (FFU) por mL.

Equação 1:

$$\frac{\text{média no número de focos das réplicas} \times \text{recíproca do fator de diluição}}{\text{volume do inóculo (mL)}} = \text{FFU/mL}$$

3.5 Avaliação da viabilidade celular em Vero dos compostos

Para acessar a porcentagem de viabilidade celular de Vero E6 perante os compostos, testamos 8 concentrações (1; 2,5; 5; 10; 13,5; 18; 24 e 32 µM) dos 7 compostos pelo método de identificação de atividade metabólica celular, utilizando o corante MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich®) na concentração de 0,2 mg/mL. Os compostos foram incubados por 48 h, quando a leitura da metabolização mitocondrial foi realizada em espectrofotômetro (Epoch®) no comprimento de onda de 492nm. Os resultados

foram apresentados em porcentagem de viabilidade comparada ao controle do ensaio, o diluente DMSO, que foi utilizado proporcionalmente à maior concentração testada dos compostos.

3.6 Concentração Citotóxica de 50% dos compostos (CC₅₀)

Este ensaio foi realizado para encontrar a concentração dos compostos correspondente a 50% de citotoxicidade em células Vero. As concentrações testadas foram (1; 2,5; 5; 10; 13,5; 18; 24; 32, 50, 75, 100 e 125 µM) conforme metodologia do item (3.5). As porcentagens de viabilidade foram inseridas no programa GraphPad® Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos) e os valores calculados através de regressão não linear. Os resultados considerados foram os valores com intervalo de confiança de 95%.

3.7 Ensaio atividade virucida contra OROV

Este ensaio foi realizado para verificar se os compostos poderiam inativar diretamente as partículas virais de OROV. Uma alta concentração (200 µM) de cada composto e do vírus (20.000 FFU) foi incubada em um volume pequeno de solução, para garantir a interação dos dois componentes por 2 horas em temperatura ambiente. A mistura foi diluída (100x) de modo que a concentração final do composto não fosse ativa nas células, mas que a quantidade de vírus fosse ainda capaz de se replicar e causar efeito citopático, caso não houvesse atividade virucida. Após 1 hora de adsorção, o protocolo seguiu conforme descrito para a titulação viral por ensaio de formação de foco infeccioso.

3.8 Ensaio de concentração inibitória de 50% (IC₅₀)

Foram inoculadas 100 FFU por poço do vírus OROV previamente titulado em monocamadas de células Vero E6, crescidas em placas de 96 poços. A inserção dos compostos se deu 2 horas antes da inoculação do vírus e após o período de adsorção viral, já no meio semissólido. A leitura do experimento foi realizada conforme protocolo de titulação por foco infeccioso mencionado previamente (3.4). Os focos foram contados com a ajuda de uma lupa. Os dados brutos foram

transformados em valores relativos conforme equação 2, comparados à media de focos infecciosos do controle positivo, sem tratamento, estes sendo considerados como 100% de presença viral. Os dados gerados foram plotados no programa GraphPad Prism 6.0, através de uma regressão não linear. Os resultados considerados foram os valores com intervalo de confiança de 95%.

Equação 2:

$$\left(\frac{\text{valor absoluto}}{\text{média controle infectado}} \right) \times 100$$

3.9 Índice de Seletividade (IS)

O Índice de Seletividade (IS) trás a relação entre a concentração tóxica de um composto contra sua concentração bioativa efetiva. O IS foi calculado pela razão CC_{50}/IC_{50} segundo equação 3. Os resultados foram apresentados \pm desvio padrão.

Equação 3:

$$IS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

3.10 Ensaio de atividade antiviral contra OROV

Em Vero E6 crescidas em placas de 24 poços, OROV foi inoculado na $MOI=1$. A inserção dos compostos se deu 2 horas antes da inoculação do vírus e após o período de adsorção viral. Após 24h ou 48h de infecção, foi realizada a coleta do sobrenadante e da monocamada celular para quantificação viral por ensaio de foco infeccioso e qRT-PCR, respectivamente.

3.11 Ensaio de tempo de adição

A variação da inibição viral pela adição dos compostos em diferentes tempos da infecção de OROV foi determinada pelo ensaio de tempo de adição. Células Vero E6 foram crescidas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos nas seguintes condições: 2 horas antes da infecção; juntamente com a infecção viral; 2, 4, 6, 8 e 12 horas pós-infecção, na concentração determinada nos ensaios anteriores de IC_{50} . Foi realizada a coleta do sobrenadante e da monocamada celular 24 horas após o início do período de adsorção viral, que

ocorreu por 2 h à 4°C, na concentração MOI=1. O material coletado foi utilizado para quantificação viral por ensaio de foco infeccioso (sobrenadante) e qRT-PCR, (RNA extraído do lisado celular).

3.12 *Extração de RNA*

As extrações de RNA de células em cultura previamente coletadas nos ensaios de tempo de adição foram realizadas utilizando kit comercial Quick-DNA/RNA Viral Kit (Zymo Research®) seguindo orientações do fabricante e quantificadas através do espectrofotômetro Nanodrop One (ThermoScientific, CA, EUA).

3.13 *qRT-PCR*

A detecção molecular de OROV foi realizada por qRT-PCR One Step (Applied Biosystems®), utilizando os primers e sondas específicos previamente publicados (Amorim et al. 2020). Em resumo, as qPCRs foram feitas com 3 µL do RNA (aproximadamente 100 ng), 2,5 µL da mistura de primers e sondas (IdT PrimeTime), e 3 µL de Master Mix 4x (Applied Biosystems®). A reação de transcriptase reversa foi realizada a 48°C por 30 minutos e a amplificação do produto ocorreu por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento-extensão a 60°C por 1 minuto. A quantificação absoluta foi baseada na construção de curva padrão com 5 diluições seriadas decimais de uma extração de RNA de OROV feita de um sobrenadante com quantidade de vírus conhecida. Os resultados então são convertidos em equivalentes de FFU por mL.

3.14 *Análise dos dados e estatística*

Os dados gerados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos). Os dados quantitativos foram apresentados como média e desvio padrão das médias. Os resultados estatísticos foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Citotoxicidade dos compostos

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de cada um dos compostos estudados, realizamos um ensaio de identificação de atividade metabólica celular, pelo método de MTT em células Vero CCL81. Sete compostos (AAK1-1, AAK1-N, LP935509, GAK-1, GAK-N, cloroquina, ribavirina) em oito concentrações (1; 2,5; 5; 10; 13,5; 18; 24 e 32 μM) foram incubados às células por 48 horas antes da leitura. Como controle, as células foram tratadas com o veículo diluidor dos compostos, DMSO, na concentração equivalente à maior testada (32 μM).

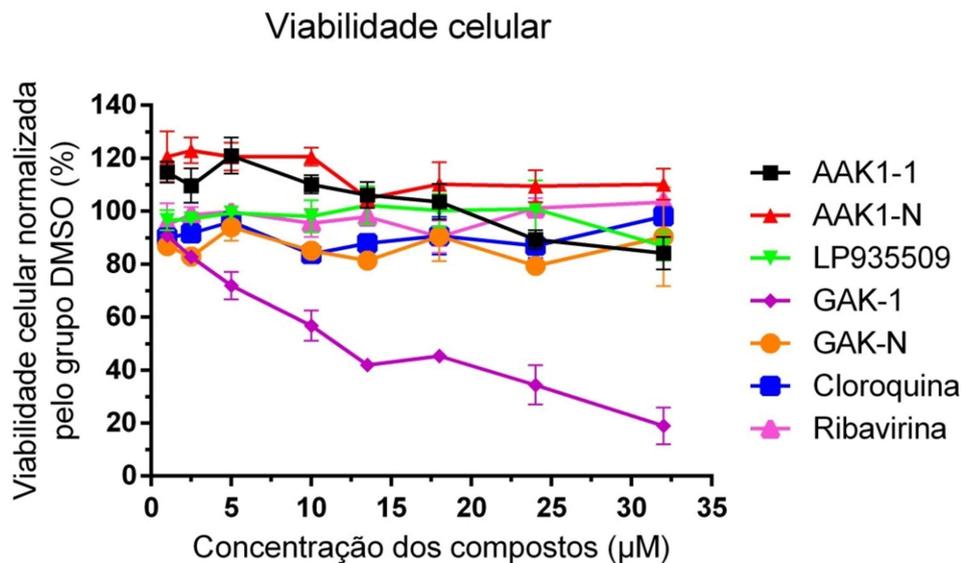


Figura 5. Viabilidade celular de Vero CCL81 na presença dos compostos. Ensaio de viabilidade celular de células Vero em diferentes concentrações e compostos após incubação por 48 horas, através do ensaio de MTT, lido na faixa de absorvância de 492 nm. O ensaio foi realizado em duplicata, em três experimentos independentes. Os valores estão representados pela média \pm SEM.

Os resultados apresentados na figura 5 indicam que dos sete compostos, apenas GAK-1 apresenta citotoxicidade acima de 20% a partir da concentração de 2,5 μM . Todos os demais compostos mantiveram a viabilidade celular acima de 80% nas oito concentrações testadas, com destaque para o composto AAK1-N, que manteve 100% da viabilidade celular em todas as concentrações. A partir desse ensaio foi possível estabelecer as concentrações a serem utilizadas no ensaio de

tempo de adição, que para GAK-1 foi a de 2,5 μM enquanto que para os outros compostos foi de 10 μM , concentração na qual a viabilidade celular foi acima de 95% em quatro (AAK1-1, AAK1-N, LP935509 e ribavirina) dos compostos testados. Portanto, exceto GAK-1, todos os compostos apresentaram baixa citotoxicidade em células Vero CCL81 através do ensaio de MTT.

4.2 Concentração citotóxica de 50% dos compostos (CC_{50})

Para acessar a concentração que reduz a viabilidade das células para 50% comparada ao controle não tratado, foi realizado o ensaio de CC_{50} com doze concentrações dos compostos (1; 2,5; 5; 10; 13,5; 18; 24; 32; 50; 75; 100 e 125 μM) para que fosse possível formar as curvas de dose-resposta (figura 9 A-G). O composto menos citotóxico foi o AAK1-N com um CC_{50} de 134,60 μM , seguido do composto ribavirina CC_{50} = 80,41 μM , cloroquina CC_{50} = 72,25 μM , AAK1-1 CC_{50} = 68,36 μM , GAK-N CC_{50} = 56,20 μM , LP935509 CC_{50} = 44,31 μM e GAK-1 CC_{50} = 24,44 μM .

Quanto maior o valor de CC_{50} obtido, menor é a toxicidade que o composto apresenta para a célula. Essa toxicidade pode depender do tipo e concentração celular, da confluência da monocamada celular e do estado metabólico da célula. Além disso, o diluidor utilizado na ressuspensão dos compostos pode influenciar na viabilidade celular em concentrações mais elevadas.

O resultado de CC_{50} é principalmente importante para definir as concentrações que podem ser utilizadas nos demais ensaios celulares de investigação de um composto. Apesar da dificuldade de extrapolação dos resultados *in vitro* para a complexidade de um organismo vivo, os métodos de avaliação de toxicidade *in vitro* apresentam algumas vantagens como minimizar o uso de animais, ter um custo mais baixo relacionado a outras abordagens, poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos de maneira facilitada, além do período de teste ser na maioria dos casos, mais curto (Rogero et al., 2003).

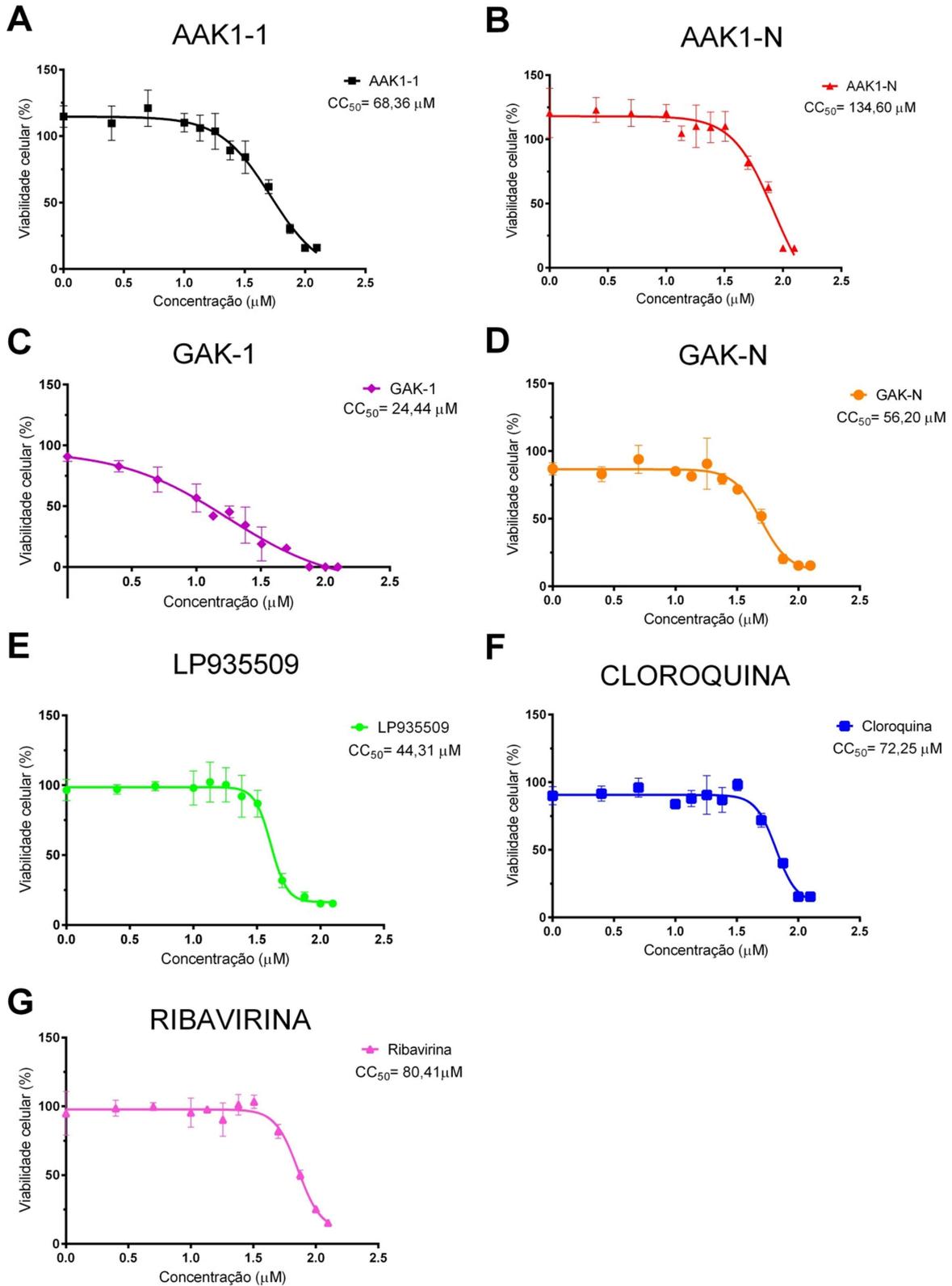


Figura 6. Concentração Citotóxica de 50% dos compostos em células Vero. Ensaio de viabilidade celular de células Vero em diferentes concentrações e compostos após incubação por 48 horas, através do ensaio de MTT, lido na faixa de absorvância de 492 nm.

O ensaio foi realizado em duplicata, em dois experimentos independentes. Os valores considerados de CC_{50} apresentam 95% de confiança.

4.3 Atividade virucida contra OROV

Para determinar se os compostos poderiam inativar diretamente as partículas virais de OROV, agindo em estruturas constituintes do vírus, realizamos o ensaio de atividade virucida.

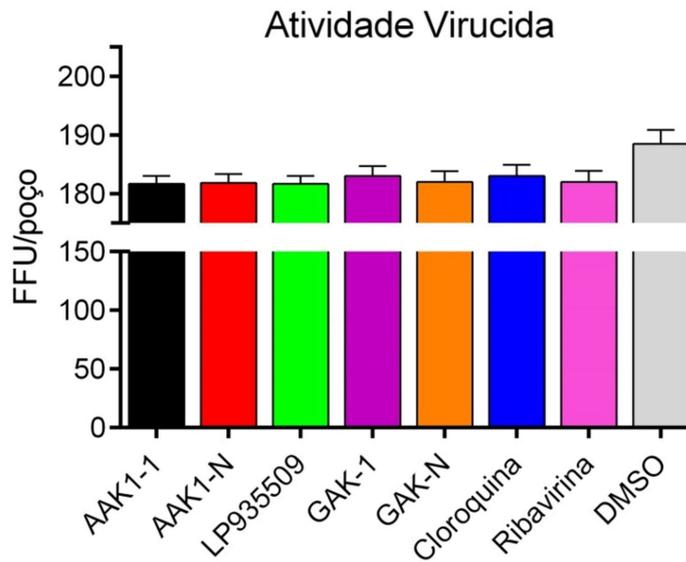


Figura 7. Atividade virucida em células Vero. Ensaio de atividade virucida dos compostos contra o vírus OROV. Após incubação por 2 horas em temperatura ambiente e diluição, 200 UFF do vírus + 1 μ M de cada composto foram incubados por 1 hora junto às células Vero CCL81. Após 36 horas, o ensaio foi fixado e relevado conforme ensaio de foco infeccioso. Os valores correspondem à três experimentos independentes realizados em triplicata e representados pela média \pm SEM.

Os resultados obtidos na figura 7 demonstram que nenhum dos sete compostos testados possui atividade virucida perante o OROV, uma vez que não houve diminuição significativa na quantidade de vírus em nenhum dos tratamentos ($P = <0,05$). Estes resultados vão de encontro com os mecanismos pré-estabelecidos na literatura para todos os compostos testados, visto que a cloroquina atua interferindo na acidificação dos lisossomos celulares; a ribavirina atua como análogo

de nucleotídeo, interferindo na replicação viral; e os compostos LP935509, AAK1-1, AAK1-N, GAK-1 e GAK-N atuam nas quinases celulares do hospedeiro.

4.4 Concentração inibitória (IC_{50}) inibidores de quinases

Para mensurar a inibição dos sete compostos realizamos o ensaio de concentração inibitória de 50% do vírus (IC_{50}) no contexto de pré-tratamento. Os gráficos apresentando as curvas de dose-resposta estão nas figuras 8 A-F. Já que o composto LP935509 tem efeito inibitório em AAK1 e GAK, fizemos também o ensaio combinado dos compostos SGC-AAK1-1 e SGC-GAK-1, este último, na concentração fixa de 2,5 μ M. Os compostos inibidores de quinases que apresentaram resultado contra OROV produziram os seguintes valores de IC_{50} : LP935509= 13,20 μ M, SGC-GAK-N= 90,58 μ M, SGC-AAK1-1= 104,60 μ M e SGC-AAK1-N= 403 μ M.

Os dados obtidos estão de acordo com alguns estudos que utilizam a inibição farmacológica de AAK1 contra a infecção de vírus diversos de RNA. Verdonck et al., (2019) sintetizaram um composto com ação inibitória *in vitro* e *in vivo* para o vírus da dengue e ebola que tem como alvo a AAK1 celular. Seu melhor composto inibiu o vírus da dengue com um valor de EC_{50} de 0,0428 μ M em monócitos derivados de células dendríticas. Para ebola, a inibição de 50% das células Huh7 ocorreu nas concentrações 1,59 μ M. Luo et al. (2020) utilizaram sunitinibe, um medicamento anticâncer que atua em AAK1, para diminuição do vírus da raiva *in vitro* e obteve o decréscimo de $1\log_{10}$ de RABV em comparação ao controle, em células de neuroblastoma de camundongo (N2a).

Apesar de no ensaio de tempo de adição o composto inibidor de GAK apresentar redução de $1\log_{10}$ das partículas de OROV a 2,5 μ M (tópico 4.7, adiante), não foi possível obter seu valor de IC_{50} , considerando que a sua alta citotoxicidade interferiu na viabilidade celular das células tratadas e infectadas. Na literatura há resultados de inibição dos vírus ebola, chikungunya, dengue (Pu, Wouters, et al., 2018) e hepatite C (Kovackova et al., 2015) *in vitro* por inibidores de GAK aprimorados quimicamente. Com exceção do trabalho de Luo et al. (2020) que utiliza um fármaco comercial, os estudos citados apresentam modificações de moléculas pré-existentes como análogos das classes de azaindóis-pirimidinas e isotiazóis-pirimidinas, com o intuito de aumentar a afinidade entre os compostos sintetizados e

as quinases alvo. Essa também foi a estratégia abordada na síntese dos compostos desenvolvidos pelo SGC e utilizados nesse estudo (Wells et al., 2020), que demonstraram resultado modesto para o vírus Oropouche.

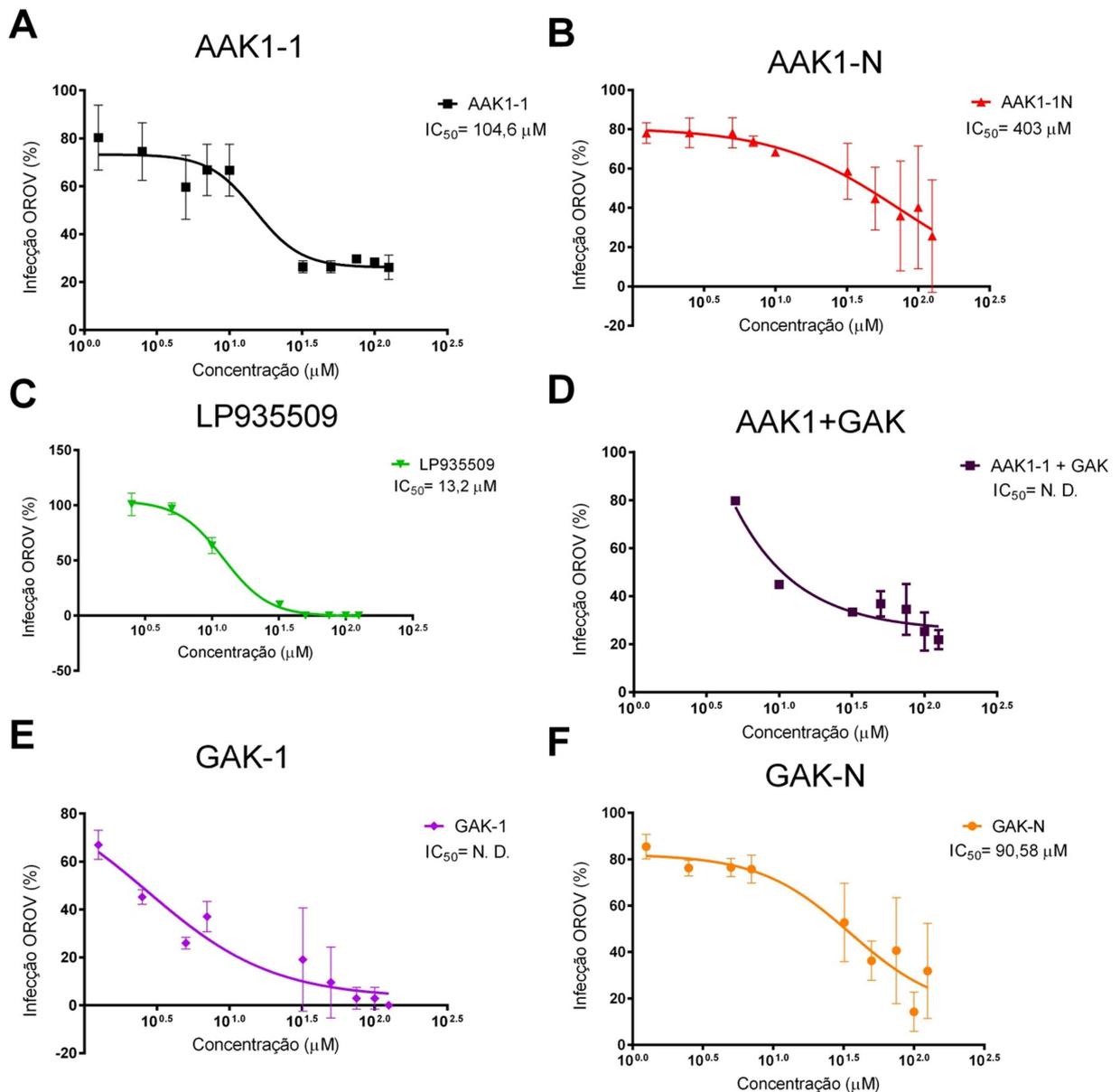


Figura 8. Concentração Inibitória de 50% dos inibidores de quinases testados contra OROV. Curvas dose-resposta da atividade de AAK1-1, AAK1-N, LP935509, AAK1-1+GAK-1, GAK-1, GAK-N testados em oito concentrações diferentes. Os números de focos contados foram normalizados pelo controle infectado e plotados através da curva de regressão não linear pelo programa Prism GraphPad versão 6.0. Valores N.D. foram valores não determinados pela curva ($P < 0,05$). As barras representam a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata \pm SD.

O nosso melhor candidato LP935509 apresentou um IC_{50} de 13,20 μ M. Os resultados obtidos podem estar relacionados ao fato de que LP935509 é descrito como um inibidor potente de AAK1 e moderado de GAK. Uma hipótese plausível é de que a inibição combinada dessas quinases pode levar a uma diminuição mais potente da CME nas células, o que nos tratamentos não combinados não seria o suficiente para interferir no ciclo replicativo do vírus OROV de maneira similar. Considerando também que AAK1 atua nos momentos iniciais do revestimento de vesículas endocíticas em brotamento, e que GAK atua na desmontagem da maquinaria da CME após a liberação da vesícula da membrana plasmática, a inibição conjunta pode reduzir a capacidade de internalização do vírus e dificultar a interação das glicoproteínas virais – Gc – com as membranas endossomais para a liberação do ribonucleocapsídeo no citoplasma celular. O tratamento combinado de inibidores de AAK1 e GAK já foi utilizado no estudo de atividade antiviral contra outros vírus. Como mencionados anteriormente, Pu, Xiao, et al. (2018) utilizaram a combinação de sunitinib e erlotinib – considerados inibidores subjacentes das quinases AAK1 e GAK, respectivamente – em camundongos infectados com o vírus da dengue e observaram redução na evolução para a dengue grave e na mortalidade dos animais. Outro estudo também relacionou a combinação em questão à proteção de camundongos contra a infecção pelos vírus da dengue e ebola, em partes pela inibição do tráfico viral regulado por AAK1 e GAK (Bekerman et al., 2017). Por fim, Neveu et al. (2015) utilizaram um modelo matemático, baseado em dados de inibição *in vitro* de HCV por sunitinib e erlotinib separadamente para verificar a sinergia da combinação desses tratamentos. Os resultados demonstraram efeito antiviral mínimo, mas significativo.

Os dados discutidos acima em conjunto corroboram para o efeito observado de LP935509 em nosso estudo, porém não refletem o resultado do tratamento combinado de SGC-AKK1-1 + SGC-GAK-1. Essas discrepâncias podem estar relacionadas às características das moléculas como diferenças estruturais e de interação, onde a estrutura de LP935509 pode ser otimizada em relação aos compostos elaborados pelo SGC. Outro possível motivo para essa discrepância seja a não compatibilidade entre os dois compostos, de modo que, além de não haver sinergia na inibição, a combinação dos mesmos tenha prejudicado a inibição de SGC-AAK1-1 que, separadamente, demonstrou resultado positivo.

Analisando os dados disponíveis na literatura sobre LP935509, verifica-se que LP935509 causou uma inibição da fosforilação de $\mu 2$ (subunidade de AP2) pela AAK1, com um IC_{50} de 2,8 nM, em células HEK293 que superexpressavam ambas proteínas, pós 3h de incubação (Kostich et al., 2016). Não há disponíveis dados relacionados à inibição viral utilizando LP935509 visto que este composto só foi testado como um inibidor de dor neuropática em modelos murinos (Kostich et al., 2016) e alguns estudos estão em andamento para verificar sua atuação em doenças neurodegenerativas (Axtman, 2021; Liu et al., 2021).

4.5 Concentração inibitória (IC_{50}) cloroquina e ribavirina

A cloroquina foi capaz de inibir OROV em altas concentrações, apresentando um IC_{50} de 4.611 μM (figura 9 A). Já a ribavirina não apresentou inibição viral nos ensaios realizados (figura 9 B). Para confirmar o papel inibidor de OROV da cloroquina, realizamos um ensaio de atividade antiviral utilizando as mesmas concentrações do ensaio de IC_{50} , porém em placas de 24 poços de células Vero, com coleta 48h após infecção com $MOI=1$ de OROV. Conforme gráfico apresentado na figura 11, o tratamento com cloroquina reduziu aproximadamente $2\log_{10}$ nas concentrações de 32 e 50 μM e $3\log_{10}$ nas concentrações de 75, 100 e 125 μM , comparados ao controle infectado tratado com DMSO.

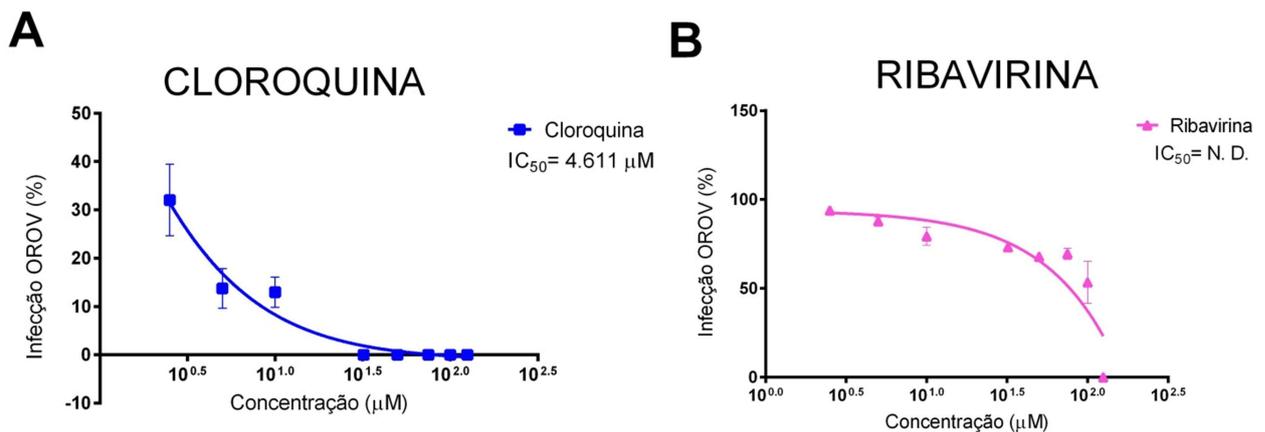


Figura 9. Concentração Inibitória de 50% dos compostos cloroquina e ribavirina contra OROV. Curvas dose-resposta da atividade de cloroquina e ribavirina testadas em oito concentrações diferentes. Os números de focos contados foram normalizados pelo controle infectado e plotados através da curva de regressão não linear pelo programa Prism GraphPad versão 6.0. Valores N.D. foram valores não determinados pela curva ($P = < 0,05$).

As barras representam a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata \pm SD.

Conforme mencionado anteriormente, a cloroquina é um inibidor de acidificação endossomal utilizado há décadas no tratamento da malária. Poucos estudos utilizam a cloroquina para a inibição de ortobunyavírus. A cloroquina inibiu a infecção de células A549 pelo vírus Germiston em mais de 50% à 34,6 μ M (Windhaber et al., 2022). Essa concentração também se mostrou ativa em nosso ensaio antiviral (figura 10). Já o trabalho de Acrani et al. (2010) mostra uma inibição de mais de 4logs₁₀ de OROV em comparação com o controle não tratado em células HeLa tratadas com 32 μ g/mL de cloroquina. Apesar de ambos os resultados serem obtidos com a perspectiva de elucidar o mecanismo de entrada desses vírus nas células estudadas, eles corroboram nossos dados de efetividade inibitória da cloroquina durante a infecção por ortobuniavírus e reforçam o potencial dessa droga, que já é utilizada como tratamento oral para outras enfermidades, como potencial tratamento para o combate da Febre do Oropouche. Estudos *in vivo* podem confirmar os efeitos observados.

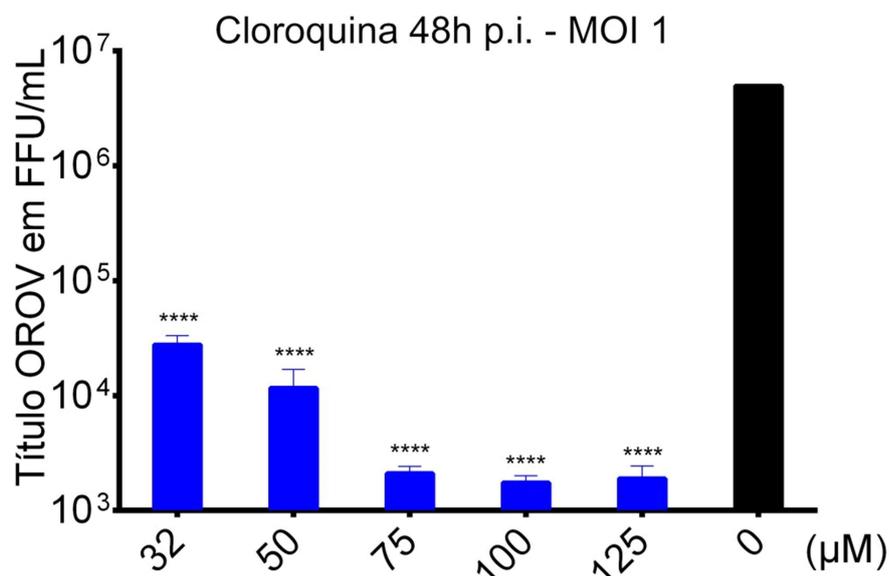


Figura 10. Atividade antiviral da cloroquina em altas concentrações contra OROV. Após pré-tratamento, células Vero foram infectadas com MOI=1 de OROV. O sobrenadante foi coletado 48h p.i e titulado através da titulação por ensaio de foco infeccioso. As barras representam a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata \pm SD. Os

asteriscos apresentam diferença estatística dos valores comparados ao controle tratado com DMSO.

Sobre o papel da cloroquina em outras infecções virais, a sua relação com o alfavírus chikungunya é a mais estudada. Há até mesmo indicações do uso de cloroquina e hidroxicloroquina para o tratamento da dor da artrite crônica causada pela chikungunya (Cíntia Nóbrega de Sousa Dias, 2019; Thiberville et al., 2013), porém, ainda há controvérsias quanto aos riscos e benefícios de seu uso para tratamento (de Lamballerie et al., 2009), inclusive sobre o alívio dos sintomas (Lamballerie et al., 2008; Roques et al., 2018). Em abordagens *in vitro*, há diversos estudos demonstrando os efeitos inibitórios de cloroquina contra o vírus chikungunya, em concentrações que vão de 5 à 20 μM (Kaur & Chu, 2013; Khan et al., 2010).

O efeito da cloroquina já foi estudado em outros arbovírus. A revisão de Al-Bari (2017) cita as propriedades lisossomotrópicas de análogos da cloroquina contra os vírus ebola, marburg, dengue, chikungunya e HIV, além de resultados de estudos em animais e clínicos com desfechos positivos utilizando a cloroquina no tratamento do HIV, dengue e gripe. Borges et al. (2013) relata um pequeno estudo duplo-cego randomizado onde 63% dos pacientes com dengue que receberam cloroquina relataram uma diminuição substancial na intensidade da dor e uma grande melhora na capacidade de realizar atividades diárias, em comparação aos que receberam placebo. Voltando ao campo dos tratamentos pré-clínicos, dois estudos recentes demonstraram que o tratamento de camundongos prenhes com hidroxicloroquina reduziu a transmissão vertical do ZIKV e limitou os danos placentários e a morte fetal (Cao et al., 2017; Shiryayev et al., 2017).

4.6 Índice de Seletividade (IS) dos compostos

O índice de seletividade é definido como a relação entre a concentração tóxica (CC_{50}) e bioativa (IC_{50}) de um composto. Um composto que exibe potencial para seguir nas triagens pré-clínicas para tornar-se um fármaco deve ter uma concentração tóxica relativamente alta com uma concentração ativa baixa (Indrayanto et al., 2021), assim, quanto maior o valor de IS, melhor é o seu composto.

Este parâmetro é muito utilizado para determinar se um composto deve seguir na investigação de atividade ou não. Dos sete compostos investigados no presente estudo, foi possível calcular o IS de 5 deles, considerando que GAK-1 e ribavirina não tiveram seus valores de IC₅₀ calculados dentro do intervalo de confiança estabelecido (95%). A tabela 1 mostra os valores obtidos. Nosso melhor candidato, LP 935509 apresenta um IS de 31,11, seguido dos compostos AAK1-1= 0,653, GAK-N= 0,620, AAK1-N= 0,333 e cloroquina= 0,015.

Segundo os autores Awouafack et al. (2013) e Indrayanto et al. (2021) um valor de IS maior ou igual à 10 foi assumido como pertencente a uma amostra potencial, que pode ser mais investigada. Uma amostra abaixo de 1 demonstra uma probabilidade considerável do composto ser tóxico em concentrações bioativas, assim como deve-se reavaliar os compostos que ficarem entre IS de 1 a 10. Uma alternativa para aumentar o valor de IS trata-se da remoção de compostos químicos da amostra ou o melhoramento da performance através de modificações estruturais para amostras construídas quimicamente (Made Ratih et al., 2019).

Tabela 1 – CC₅₀, IC₅₀ e IS

Compostos	CC ₅₀	IC ₅₀	IS
AAK1-1	68,36 ± 2,60	104,6 ± 2,99	0,653
AAK1-N	134,60 ± 2,71	403 ± 8,56	0,333
GAK-1	24,44 ± 6,73	-	-
GAK-N	56,20 ± 1,63	90,58 ± 6,06	0,620
LP935509	44,31 ± 1,66	13,20 ± 2,32	31,11
Cloroquina	72,25 ± 1,36	4.611 ± 460	0,015
Ribavirina	80,41 ± 1,43	-	-

Baseados nesses achados, podemos concluir que nosso melhor candidato, LP935509 possui um bom índice de seletividade, além de ter como alvo estruturas celulares do hospedeiro, o que pode driblar possíveis mecanismos de resistência ao tratamento, uma vez aplicado para o combate de infecções virais como a Febre do Oropouche.

4.7 Avaliação do ensaio de tempo-de-adicção

Com o objetivo de avaliar a inibição viral em diferentes tempos do ciclo replicativo de OROV, realizamos o ensaio de tempo-de-adicção (figura 11 A-B). Verificou-se no sobrenadante das células uma queda de um pouco mais de $1\log_{10}$ na quantidade de vírus viáveis, quando as células foram tratadas por 2h previamente à infecção para cinco compostos testados (SGC-AAK1-1, SGC-AAK1-N, SGC-GAK-1, SGC-GAK-N e LP935509). Essa queda se manteve para quatro compostos testados (SGC-AAK1-N, LP935509, SGC-GAK-1 e SGC-GAK-N) no tratamento junto à infecção (0h) e após o período de adsorção viral (2h). Nos tempos posteriores não houve queda na quantidade de vírus viáveis no sobrenadante. Analisando o RNA viral extraído do lisado celular, houve diminuição na condição de pré-tratamento dos compostos SGC-AAK1-N, LP935509, SGC-GAK-1 e SGC-GAK-N. Esta redução deu-se de maneira menos expressiva que no sobrenadante das células e não se repetiu nos tempos de tratamento posteriores, mostrando que a produção de genoma viral nesses tempos ocorreu de forma semelhante às células infectadas tratadas somente com o veículo dos compostos (DMSO).

A queda na quantidade de vírus viáveis nas condições de tratamento prévio e horas iniciais indica que a atuação dos compostos inibidores de quinases nas células infectadas pode estar interferindo nos momentos iniciais do ciclo replicativo de OROV. Esse é um resultado esperado tratando-se dos compostos SGC-AAK1-1 e SGC-GAK-1, visto que ambos inibem respectivamente a atividade das quinases envolvidas no início (AAK1) e fim (GAK) da formação das vesículas revestidas de clatrina, durante a EMC. Adicionalmente, a inibição dupla dessas quinases, realizada pelo tratamento das células com o composto LP935509, exibiu a maior inibição dentre os tratamentos que se mostraram efetivos, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa, se comparada aos outros dois compostos. Não se verificou, portanto, um efeito somatório na inibição por LP935509 a $10\ \mu\text{M}$. A inibição das partículas de OROV pelos compostos SGC-AAK1-N e SGC-GAK-N são resultados inesperados e abrem margem para interpretações como a de que, possivelmente, outras quinases celulares participem do processo de entrada do vírus Oropouche em células Vero ou mesmo que OROV pode usar outras vias além da endocitose por vesículas de clatrina para a entrada celular. De fato, outras vias de entrada celular já foram descritas para outros arbovírus, como endocitose

mediada por caveolina (Xing et al., 2020; Carvalho et al., 2017) e macropinocitose (Lee et al., 2019).

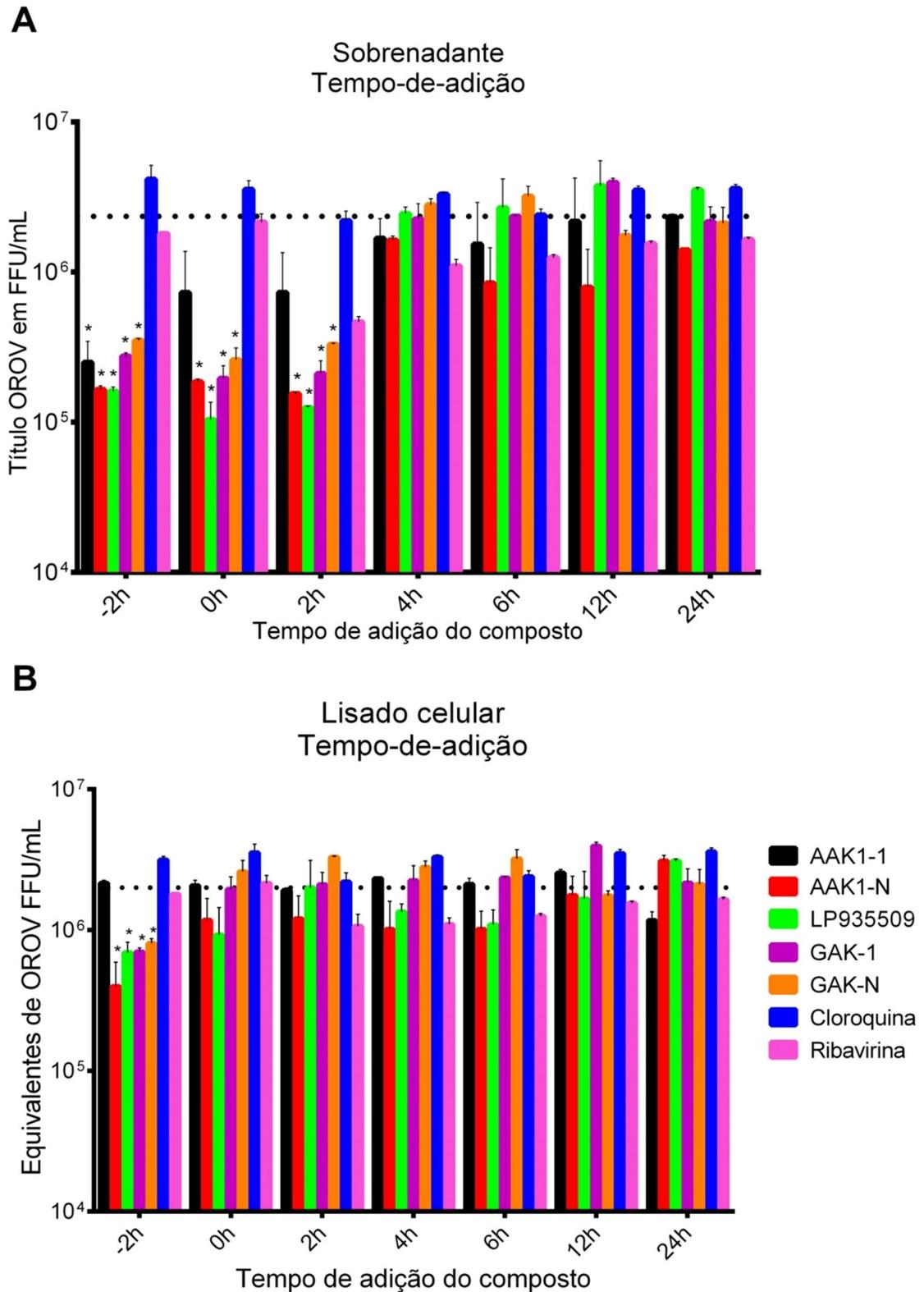


Figura 11. Detecção viral após tratamento em diferentes etapas do processo replicativo de OROV. A. Titulação do sobrenadante por FFU no experimento de tempo de

adição. **B.** Quantificação de RNA extraído do lisado celular por qRT-PCR no experimento de tempo de adição. Os resultados foram realizados em duplicata. As barras representam a média \pm SEM. As linhas horizontais representam a média do controle positivo (células infectadas tratadas com o veículo DMSO). A diferença estatística foi realizada através do teste TwoWay ANOVA associado ao teste de múltiplas comparações de Dunnett's.

Embora o decréscimo das partículas virais viáveis não esteja atrelado a uma queda proporcional na quantidade de genoma viral encontrada no interior dessas células, o que significa que o processo de tradução de RNA genômico viral não foi afetado pelo tratamento, os dados de inibição obtidos podem indicar que os compostos ocasionam alguma modificação nas etapas posteriores à formação das vesículas revestidas de clatrina em direção ao citosol. Por fim, estudos direcionados a desvendar o papel dos cinco inibidores de quinases presentes neste estudo frente à maquinaria celular são necessários para corroborar com tal hipótese.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos inferir que compostos inibidores de quinases celulares foram capazes de inibir o vírus OROV nas condições de pré-tratamento e tratamento até 2h após o período de adsorção do vírus. Nosso melhor candidato, o composto LP935509 com um $IC_{50} = 13,20 \mu M$, inibe duplamente as quinases AAK1 e GAK, o que corrobora com os achados da literatura sobre a importância da endocitose mediada por clatrina para a internalização do vírus Oropouche. Além disso, o valor de IC_{50} representa um composto com alta atividade em seu alvo, segundo a literatura. O inibidor apenas de AAK1, SGC-AAK1-1, obteve $IC_{50} = 104,60 \mu M$ (baixa atividade), seguido pelos compostos SGC-GAK-N $IC_{50} = 90,58 \mu M$ (atividade moderada) e SGC-AAK1-N $IC_{50} = 403 \mu M$ (muito baixa atividade). Também podemos inferir que a acidificação lisossomal tem um papel considerável nas etapas iniciais da infecção, visto que a inibição dessas estruturas levou à uma diminuição de partículas virais de OROV depois do tratamento com o composto cloroquina em altas concentrações, com um $IC_{50} = 4.611 \mu M$.

Neste estudo observamos a atividade de inibidores das quinases AAK1, GAK, de outras quinases celulares não especificadas e da inibição da acidificação lisossomal na infecção *in vitro* pelo vírus OROV. É importante salientar que até o momento, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares usurpados pelo vírus OROV para sua replicação e manutenção em células hospedeiras. Nossos dados sugerem ainda que o vírus OROV pode utilizar outras quinases e/ou outros mecanismos celulares de entrada não relacionados à endocitose mediada por clatrina. A investigação desse processo permitirá elucidar não somente os mecanismos de ação de atividade inibitória de candidatos a fármacos, como enriquecer o repertório científico sobre a interação de OROV e células hospedeiras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acrani, G. O., Gomes, R., Proença-Módena, J. L., da Silva, A. F., Oliveira Carminati, P., Silva, M. L., Santos, R. I. M., & Arruda, E. (2010). Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Research*, 149(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.12.013>
- Adhikari, U. K., Tayebi, M., & Rahman, M. M. (2018). Immunoinformatics approach for epitope-based peptide vaccine design and active site prediction against polyprotein of emerging oropouche virus. *Journal of Immunology Research*, 2018.
- Al-Bari, M. A. A. (2017). Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacology Research & Perspectives*, 5(1), e00293.
- Almeida, G. M., Souza, J. P., Mendes, N. D., Pontelli, M. C., Pinheiro, N. R., Nogueira, G. O., Cardoso, R. S., Paiva, I. M., Ferrari, G. D., Veras, F. P., & others. (2021). Neural Infection by Oropouche Virus in Adult Human Brain Slices Induces an Inflammatory and Toxic Response. *Frontiers in Neuroscience*, 15.
- Awouafack, M. D., McGaw, L. J., Gottfried, S., Mbouangouere, R., Tane, P., Spittler, M., & Eloff, J. N. (2013). Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 289. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-289>
- Bekerman, E., Neveu, G., Shulla, A., Brannan, J., Pu, S.-Y., Wang, S., Xiao, F., Barouch-Bentov, R., Bakken, R. R., Mateo, R., Govero, J., Nagamine, C. M., Diamond, M. S., De Jonghe, S., Herdewijn, P., Dye, J. M., Randall, G., & Einav, S. (2017). Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(4), 1338–1352. <https://doi.org/10.1172/JCI89857>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., & others. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507.
- Borges, M. C., Castro, L. A., & Fonseca, B. A. L. da. (2013). Chloroquine use improves dengue-related symptoms. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108,

596–599.

- Cao, B., Parnell, L. A., Diamond, M. S., & Mysorekar, I. U. (2017). Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *Journal of Experimental Medicine*, 214(8), 2303–2313. <https://doi.org/10.1084/jem.20170957>
- Carvalho C., Silva J., Oliveira A., Gomes A. On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. *PeerJ*. 2017;5:e3245. Published 2017 Apr 27. doi:10.7717/peerj.3245
- Carvalho, V. L., & Long, M. T. (2021). Perspectives on new vaccines against arboviruses using insect-specific viruses as platforms. *Vaccines*, 9(3), 263.
- Chiang, J. O., Azevedo, R. S., Justino, M. C. A., Matos, H. J., Cabeça, H. L. S., Silva, S. P., Henriques, D. F., Silva, E. V. P., Andrade, G. S. S., Vasconcelos, P. F. C., & others. (2021). Neurological disease caused by Oropouche virus in northern Brazil: should it be included in the scope of clinical neurological diseases? *Journal of NeuroVirology*, 1–5.
- Chu, J. J. H., & Ng, M. L. (2004). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of Virology*, 78(19), 10543–10555.
- Cíntia Nóbrega de Sousa Dias. (2019). Células T CD8+ na infecção pelo vírus da Chikungunya: avaliação das características fenotípicas e investigação do papel imunomodulador da Riparina III. *Repositório Institucional Da UFPB*, 133. <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/19549>
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2002). Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 156(5), 921–929.
- Conner, S. D., Schröter, T., & Schmid, S. L. (2003). AAK1-mediated micro2 phosphorylation is stimulated by assembled clathrin. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4(12), 885–890. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9219.2003.0142.x>
- da Rosa, J. F. T., de Souza, W. M., de Paula Pinheiro, F., Figueiredo, M. L., Cardoso, J. F., Acrani, G. O., & Nunes, M. R. T. (2017). Oropouche virus: clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected Orthobunyavirus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 1019–1030.
- DA ROSA, T. (1989). Primeiro Registro de Epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. *Revista Do Instituto de*

- Medicina Tropical de São Paulo*, 31((4)), 271–278.
- de Lamballerie, X., Ninove, L., & Charrel, R. N. (2009). Antiviral treatment of chikungunya virus infection. *Infectious Disorders Drug Targets*, 9(2), 101–104. <https://doi.org/10.2174/187152609787847712>
- de Mendonça, S. F., Rocha, M. N., Ferreira, F. V., Leite, T. H. J., Amadou, S. C. G., Sucupira, P. H. F., Marques, J. T., Ferreira, A. G. A., & Moreira, L. A. (2021). Evaluation of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes' Competence to Oropouche virus Infection. *Viruses*, 13(5), 755.
- de Souza Luna, L. K., Rodrigues, A. H., Santos, R. I. M., Sesti-Costa, R., Criado, M. F., Martins, R. B., Silva, M. L., Delcaro, L. S., Proença-Modena, J. L., Figueiredo, L. T. M., Acrani, G. O., & Arruda, E. (2017). Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. *Journal of Medical Virology*, 89(6), 1108–1111. <https://doi.org/10.1002/jmv.24722>
- dos Santos Fonseca, L. M., Carvalho, R. H., Bandeira, A. C., Sardi, S. I., & Campos, G. S. (2019). Detection of Oropouche virus in saliva and urine samples of febrile patients in Salvador, Bahia, Brazil. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, JJID--2019.
- Farias, K. J. S., Machado, P. R. L., Muniz, J. A. P. C., Imbeloni, A. A., & da Fonseca, B. A. L. (2015). Antiviral activity of chloroquine against dengue virus type 2 replication in *Aotus* monkeys. *Viral Immunology*, 28(3), 161–169.
- Figueiredo, L. T. M. (2007). Emergent arboviruses in Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(2), 224–229. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000200016>
- Fischer, C., Jo, W. K., Haage, V., Moreira-Soto, A., de Oliveira Filho, E. F., & Drexler, J. F. (2021). Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(9), 1221–1229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.047>
- Gibb, R., Redding, D. W., Chin, K. Q., Donnelly, C. A., Blackburn, T. M., Newbold, T., & Jones, K. E. (2020). Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. *Nature*, 584(7821), 398–402.
- Gubler, D. J. (2002). The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Archives of Medical Research*, 33(4), 330–342. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00378-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00378-8)
- He, K., Song, E., Upadhyayula, S., Dang, S., Gaudin, R., Skillern, W., Bu, K.,

- Capraro, B. R., Rapoport, I., Kusters, I., & others. (2020). Dynamics of Auxilin 1 and GAK in clathrin-mediated traffic. *Journal of Cell Biology*, 219(3).
- Huang, Y.-J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2019). Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Current Opinion in Virology*, 34, 104–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.01.001>
- Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). *Chapter Six - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research* (A. A. B. T.-P. of D. S. Al-Majed Excipients and Related Methodology (ed.); Vol. 46, pp. 273–307). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.005>
- Jernigan, D. B., Raghunathan, P. L., Bell, B. P., Brechner, R., Bresnitz, E. A., Butler, J. C., Cetron, M., Cohen, M., Doyle, T., Fischer, M., & others. (2002). Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerging Infectious Diseases*, 8(10), 1019.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–993.
- Kadlecova, Z., Spielman, S. J., Loerke, D., Mohanakrishnan, A., Reed, D. K., & Schmid, S. L. (2017). Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2. *The Journal of Cell Biology*, 216(1), 167–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608071>
- Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>
- Kaur, P., & Chu, J. J. H. (2013). Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges. *Drug Discovery Today*, 18(19), 969–983. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.002>
- Keyaerts, E., Li, S., Vijgen, L., Rysman, E., Verbeeck, J., Van Ranst, M., & Maes, P. (2009). Antiviral activity of chloroquine against human coronavirus OC43 infection in newborn mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3416–3421.
- Khan, M., Santhosh, S. R., Tiwari, M., Lakshmana Rao, P. V., & Parida, M. (2010). Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. *Journal of Medical Virology*, 82(5), 817–824.

- Kirchhausen, T., Owen, D., & Harrison, S. C. (2014). Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), a016725.
- Kostich, W., Hamman, B. D., Li, Y.-W., Naidu, S., Dandapani, K., Feng, J., Easton, A., Bourin, C., Baker, K., Allen, J., & others. (2016). Inhibition of AAK1 kinase as a novel therapeutic approach to treat neuropathic pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358(3), 371–386.
- Kovackova, S., Chang, L., Bekerman, E., Neveu, G., Barouch-Bentov, R., Chaikuad, A., Heroven, C., Šála, M., De Jonghe, S., Knapp, S., Einav, S., & Herdewijn, P. (2015). Selective Inhibitors of Cyclin G Associated Kinase (GAK) as Anti-Hepatitis C Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(8), 3393–3410. <https://doi.org/10.1021/jm501759m>
- Lamballerie, X. De, Boisson, V., Reynier, J.-C., Enault, S., Charrel, R. N., Flahault, A., Roques, P., & Grand, R. Le. (2008). On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(6), 837–840.
- Lee C., Mohamed Hussain K., Chu J. (2019) Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13(8): e0007610. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007610>
- Lee, D.-W., Wu, X., Eisenberg, E., & Greene, L. E. (2006). Recruitment dynamics of GAK and auxilin to clathrin-coated pits during endocytosis. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 17), 3502–3512. <https://doi.org/10.1242/jcs.03092>
- Lee, I., Bos, S., Li, G., Wang, S., Gadea, G., Desprès, P., & Zhao, R. Y. (2018). Probing molecular insights into Zika virus--host interactions. *Viruses*, 10(5), 233.
- Liang, G., Gao, X., & Gould, E. A. (2015). Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerging Microbes & Infections*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.18>
- Lorenz, C., Azevedo, T. S., Virginio, F., Aguiar, B. S., Chiaravalloti-Neto, F., & Suesdek, L. (2017). Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), e0005959.
- Luo, J., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, Q., Chen, L., Zhang, B., Luo, Y., Huang, S., & Guo, X. (2020). Rhabdovirus Infection Is Dependent on Serine/Threonine Kinase AP2-Associated Kinase 1. *Life (Basel, Switzerland)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/life10090170>
- Made Ratih, G. A., Imawati, M. F., Nugroho, R. R., Purwanti, D. I., Wongso, S.,

- Prajogo, B., & Indrayanto, G. (2019). Phytochemicals of Gandarusa (*Justicia gendarussa*) and its preparations. *Natural Product Communications*, *14*(6), 1934578X19851406.
- McCormick, J. B., King, I. J., Webb, P. A., Scribner, C. L., Craven, R. B., Johnson, K. M., Elliott, L. H., & Belmont-Williams, R. (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *The New England Journal of Medicine*, *314*(1), 20–26.
- Mercer, J., Schelhaas, M., & Helenius, A. (2010). Virus entry by endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, *79*, 803–833.
- Morens, D. M., Folkers, G. K., & Fauci, A. S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, *430*(6996), 242–249.
- Morens, D. M., Folkers, G. K., & Fauci, A. S. (2008). Emerging infections: a perpetual challenge. *The Lancet Infectious Diseases*, *8*(11), 710–719. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70256-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70256-1)
- Mudhakir, D. Harashima H. (2009).. Learning from the Viral Journey: How to Enter Cells and How to Overcome Intracellular Barriers to Reach the Nucleus. *The AAPS Journal*, *65–77*, *11*(1). <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9080-9>
- Nelson, P. P., Rath, B. A., Fragkou, P. C., Antalis, E., Tsiodras, S., & Skevaki, C. (2020). Current and Future Point-of-Care Tests for Emerging and New Respiratory Viruses and Future Perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00181>
- Neveu, G., Barouch-Bentov, R., Ziv-Av, A., Gerber, D., Jacob, Y., & Einav, S. (2012). Identification and targeting of an interaction between a tyrosine motif within hepatitis C virus core protein and AP2M1 essential for viral assembly. *PLoS Pathog*, *8*(8), e1002845.
- Neveu, G., Ziv-Av, A., Barouch-Bentov, R., Berkerman, E., Mulholland, J., & Einav, S. (2015). AP-2-associated protein kinase 1 and cyclin G-associated kinase regulate hepatitis C virus entry and are potential drug targets. *Journal of Virology*, *89*(8), 4387–4404. <https://doi.org/10.1128/JVI.02705-14>
- Nunes, M. R. T., de Souza, W. M., Savji, N., Figueiredo, M. L., Cardoso, J. F., da Silva, S. P., de Lima, C. P. da S., Vasconcelos, H. B., Rodrigues, S. G., Lipkin, W. I., & others. (2019). Oropouche orthobunyavirus: Genetic characterization of full-length genomes and development of molecular methods to discriminate natural reassortments. *Infection, Genetics and Evolution*, *68*, 16–22.
- Paeshuyse, J., Dallmeier, K., & Neyts, J. (2011). Ribavirin for the treatment of chronic

- hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. *Current Opinion in Virology*, 1(6), 590–598.
- Parker, W. B. (2005). Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Research*, 107(2), 165–171.
- Partlow, E. A., Baker, R. W., Beacham, G. M., Chappie, J. S., Leschziner, A. E., & Hollopeter, G. (2019). A structural mechanism for phosphorylation-dependent inactivation of the AP2 complex. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.50003>
- Portal da Agência Fapesp. (2017). *Vírus oropouche pode emergir e causar problemas de saúde pública no Brasil*. Agência Fapesp.
- Proenca-Modena, J. L., Hyde, J. L., Sesti-Costa, R., Lucas, T., Pinto, A. K., Richner, J. M., Gorman, M. J., Lazear, H. M., & Diamond, M. S. (2016). Interferon-regulatory factor 5-dependent signaling restricts orthobunyavirus dissemination to the central nervous system. *Journal of Virology*, 90(1), 189–205.
- Pu, S.-Y., Wouters, R., Schor, S., Rozenski, J., Barouch-Bentov, R., Prugar, L. I., O'Brien, C. M., Brannan, J. M., Dye, J. M., Herdewijn, P., De Jonghe, S., & Einav, S. (2018). Optimization of Isothiazolo[4,3-b]pyridine-Based Inhibitors of Cyclin G Associated Kinase (GAK) with Broad-Spectrum Antiviral Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(14), 6178–6192. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00613>
- Pu, S.-Y., Xiao, F., Schor, S., Bekerman, E., Zanini, F., Barouch-Bentov, R., Nagamine, C. M., & Einav, S. (2018). Feasibility and biological rationale of repurposing sunitinib and erlotinib for dengue treatment. *Antiviral Research*, 155, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.05.001>
- Randolph, A. G., & Wang, E. E. (1996). Ribavirin for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. A systematic overview. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 150(9), 942–947. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1996.02170340056011>
- Ribeiro, M. A., Pontelli, M. C., Souza, G. F., Muraro, S. P., Toledo-Teixeira, D. A., Forato, J., Bispo-dos-Santos, K., Barbosa, N. S., Martini, M. C., Parise, P. L., Vieira, A., Milanez, G. P., daSilva, L. L. P., Lalwani, P. J., Farias, A. S., Vinolo, M. A. R., Sesti-Costa, R., Arruda, E & Proenca-Modena, J. L. (2020). Oropouche Virus Infects, Persists and Induces IFN Response in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells as Identified by RNA PrimeFlow™ and qRT-PCR Assays. *Viruses*, 12(7), 785.

- Ringelhan, M., McKeating, J. A., & Protzer, U. (2018). Correction to 'Viral hepatitis and liver cancer.' *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1737), 20170339.
- Rogero, S. O., Malmonge, S. M., Lugão, A. B., Ikeda, T. I., Miyamaru, L., & Cruz, A. S. (2003). In vitro cytotoxicity test: Comparative study between two methodologies. *Materials Research*, 6(3), 317–320.
- Roques, P., Thiberville, S.-D., Dupuis-Maguiraga, L., Lum, F.-M., Labadie, K., Martinon, F., Gras, G., Lebon, P., Ng, L. F. P., De Lamballerie, X., & Le Grand, R. (2018). Paradoxical Effect of Chloroquine Treatment in Enhancing Chikungunya Virus Infection. *Viruses*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/v10050268>
- Rust M., Lakadamyali M., Zhang F., Zhuang X. (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature Structural & Molecular Biology*, 567–573, 11(6). <https://doi.org/10.1038/nsmb769>
- Sakkas, H., Bozidis, P., Franks, A., & Papadopoulou, C. (2018). Oropouche fever: a review. *Viruses*, 10(4), 175.
- Santos, R. I. M., Rodrigues, A. H., Silva, M. L., Mortara, R. A., Rossi, M. A., Jamur, M. C., Oliver, C., & Arruda, E. (2008). Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Research*, 138(1–2), 139–143.
- Savarino, A., Boelaert, J. R., Cassone, A., Majori, G., & Cauda, R. (2003). Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(11), 722–727.
- Shiryaev, S. A., Mesci, P., Pinto, A., Fernandes, I., Sheets, N., Shrestha, S., Farhy, C., Huang, C.-T., Strongin, A. Y., Muotri, A. R., & Terskikh, A. V. (2017). Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for Zika Virus treatment and prophylaxis. *Scientific Reports*, 7(1), 15771. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15467-6>
- Smith, D. W. (2018). Arboviruses. *Microbiology Australia*, 39(2), 65.
- Smith, D. W., Frankel, L. R., Mathers, L. H., Tang, A. T. S., Ariagno, R. L., & Prober, C. G. (1991). A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infection. *New England Journal of Medicine*, 325(1), 24–29.
- Soniya, K., Yadav, S., Boora, S., Kaushik, S., Yadav, J. P., & Kaushik, S. (2021). The Cat Que Virus: a resurfacing orthobunyavirus could lead to epidemics.

- VirusDisease*, 32(4), 635–641.
- Stubbs, S. H., Pontelli, M. C., Mishra, N., Zhuo, C., de Paula Souza, J., Viana, R. M. M., Lipkin, W. I. H., Knipe, D., Arruda, E. A., & Whelan, S. P. J. (2021). Vesicular stomatitis virus chimeras expressing the Oropouche virus glycoproteins elicit protective immune responses in mice. *BioRxiv*.
- Thiberville, S.-D., Moyen, N., Dupuis-Maguiraga, L., Nougairède, A., Gould, E. A., Roques, P., & de Lamballerie, X. (2013). Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, 99(3), 345–370. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>
- Ushijima, Y., Abe, H., Ondo, G. N., Bikangui, R., Loembé, M. M., Zadeh, V. R., Essimengane, J. G. E., Mbouna, A. V. N., Bache, E. B., Agnandji, S. T., & others. (2021). Surveillance of the major pathogenic arboviruses of public health concern in Gabon, Central Africa: increased risk of West Nile virus and dengue virus infections. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1–11.
- Verdonck, S., Pu, S.-Y., Sorrell, F. J., Elkins, J. M., Froeyen, M., Gao, L.-J., Prugar, L. I., Dorosky, D. E., Brannan, J. M., Barouch-Bentov, R., Knapp, S., Dye, J. M., Herdewijn, P., Einav, S., & De Jonghe, S. (2019). Synthesis and Structure-Activity Relationships of 3,5-Disubstituted-pyrrolo[2,3- b]pyridines as Inhibitors of Adaptor-Associated Kinase 1 with Antiviral Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(12), 5810–5831. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00136>
- Wang, C., Wang, J., Shuai, L., Ma, X., Zhang, H., Liu, R., Chen, W., Wang, X., Ge, J., Wen, Z., & others. (2020). The serine/threonine kinase AP2-associated kinase 1 plays an important role in rabies virus entry. *Viruses*, 12(1), 45.
- Weaver, S. C. (2005). Host range, amplification and arboviral disease emergence. In C. J. Peters & C. H. Calisher (Eds.), *Infectious Diseases from Nature: Mechanisms of Viral Emergence and Persistence* (pp. 33–44). Springer Vienna.
- Wells, C., Couñago, R. M., Limas, J. C., Almeida, T. L., Cook, J. G., Drewry, D. H., Elkins, J. M., Gileadi, O., Kapadia, N. R., Lorente-Macias, A., Pickett, J. E., Riemen, A., Ruela-de-Sousa, R. R., Willson, T. M., Zhang, C., Zuercher, W. J., Zutshi, R., & Axtman, A. D. (2020). SGC-AAK1-1: A Chemical Probe Targeting AAK1 and BMP2K. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(3), 340–345. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00399>
- Windhaber, S., Xin, Q., Uckeley, Z. M., Koch, J., Obr, M., Garnier, C., Luengo-Guyonnot, C., Duboeuf, M., Schur, F. K. M., & Lozach, P.-Y. (2022). The

- Orthobunyavirus Germiston Enters Host Cells from Late Endosomes. *Journal of Virology*, 96(5), e02146-21. <https://doi.org/10.1128/jvi.02146-21>
- World Health Organization. (2003). *Global climate change and health: an old story writ large*. WHO.
- World Health Organization. (2019). *Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability*. WHO.
- Wouters, R., Pu, S.-Y., Froeyen, M., Lescrinier, E., Einav, S., Herdewijn, P., & De Jonghe, S. (2019). Cyclin G-associated kinase (GAK) affinity and antiviral activity studies of a series of 3-C-substituted isothiazolo[4,3-b]pyridines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 163, 256–265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.065>
- Xiao, F., Wang, S., Barouch-Bentov, R., Neveu, G., Pu, S., Beer, M., Schor, S., Kumar, S., Nicolaescu, V., Lindenbach, B. D., Randall, G., & Einav, S. (2018). Interactions between the Hepatitis C Virus Nonstructural 2 Protein and Host Adaptor Proteins 1 and 4 Orchestrate Virus Release. *MBio*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02233-17>
- Xing Y., Wen Z., Gao W., Lin Z., Zhong J., Jiu Y. Multifaceted Functions of Host Cell Caveolae/Caveolin-1 in Virus Infections. *Viruses*. 2020; 12(5):487. <https://doi.org/10.3390/v12050487>

7. APÊNDICE 1 – Declarações éticas e autorais



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgeb@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada “Atividade **Antiviral de Inibidores de AAK1 e GAK na Infecção pelo Vírus Oropouche**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Karina Bispo dos Santos
Nome do(a) aluno(a): **Karina Bispo dos Santos**

Assinatura: José Luiz Proença Módena
Nome do(a) orientador(a): **José Luiz Proença Módena**

Data: 07 de dezembro de 2022

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 **Atividade Antiviral de Inibidores de AAK1 e GAK na Infecção pelo Vírus Oropouche**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 07 de dezembro de 2022

Assinatura: Karina Bispo dos Santos
Nome do(a) autor(a): **Karina Bispo dos Santos**
RG n.º 48966638-3

Assinatura: José Luiz Proença Módena
Nome do(a) orientador(a): **José Luiz Proença Módena**
RG n.º 32744098-3