



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

SAYONARA MARIA CALADO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE NOVOS
DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS**

Recife
2020

SAYONARA MARIA CALADO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE NOVOS
DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS**

Recife
2020

SAYONARA MARIA CALADO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE NOVOS
DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof^a. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta.

Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Co-orientador: Dr. Rafael Freitas de Oliveira França

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Gonçalves, Sayonara Maria Calado

Avaliação da potencial atividade antiviral de novos derivados tiazolidínicos/
Sayonara Maria Calado Gonçalves – 2020.

104 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadores: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo e Rafael Freitas de
Oliveira França

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica,
2020.

Inclui referências e anexo.

1. Thiazoles 2. Vírus Zica 3. Síntese orgânica I. Pitta, Maira Galdino da Rocha
(orient.) II. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (coorient.) III. França,
Rafael Freitas de Oliveira (coorient.) IV. Título

547.594

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 184

SAYONARA MARIA CALADO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE NOVOS
DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 27/08/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Marina Galdino da Rocha Pitta (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. César Augusto Souza de Andrade (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Paula Sandrin Garcia (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha Orientadora Prof^a. Dr^a Maira Galdino da Rocha Pitta pela confiança na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo pelo apoio e estímulo durante o desenvolvimento da tese.

Ao meu co-orientador Dr. Rafael Freitas de Oliveira França do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaviTE) do Instituto Aggeu Magalhães por todo o suporte científico e pela colaboração para a realização dos ensaios *in vitro*.

Ao Prof. Marcelo Zaldini pela sua colaboração para o desenvolvimento do ensaio de modelagem molecular.

A toda a equipe que compõe o Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos pela colaboração para a síntese e caracterização das moléculas usadas para o desenvolvimento do projeto.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Por último e não menos importante, gostaria de agradecer a todos os amigos e colegas do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental e do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas por todo o suporte emocional e científico que compartilharam comigo nesses 4 anos.

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) tornou-se problema de saúde pública mundial não somente pela sua capacidade de disseminação e infecção em humanos, como também pela sua associação ao desenvolvimento de síndromes neurológicas, as quais apresentam elevado grau de morbidade e mortalidade. A atividade antiviral das tiazolidinas (TZDs) já vem sendo descritas na literatura. Como ainda não há um tratamento específico para a infecção do ZIKV, nos propomos a avaliar 40 novos derivados TZDs como possíveis agentes terapêuticos candidatos para o tratamento da infecção causada pelo vírus. Após a síntese e caracterização dos derivados GQs (103, 106, 138, 140, 393, 394, 396, 400, 402 e 403), JBs (3, 10, 16, 17, 18, 19, 23 e 24), ZKCs (1 – 10), ZKCE-1 e FTs (16, 19, 31, 32, 34, 35, 36, 38, 39 e 40) estes foram avaliados tanto *in vitro*, quanto *in silico*. *In vitro*, após triagem quanto a citotoxicidade e atividade antiviral, os derivados (GQ394, 396 e 402; ZKC2, 3, 4, 8 e 9; JB3 e os FTs 32 e 39) se destacaram e foram avaliados quanto a sua capacidade de reduzir o número de cópias de RNA viral em células Vero pré e pós infecção pelo ZIKV. Os demais derivados se mostraram tóxicos para célula e sem ação frente ao vírus, dessa maneira não foram selecionados para os ensaios posteriores. Em paralelo, aos ensaios *in vitro*, o docking molecular foi realizado para avaliar se os derivados teriam a capacidade de ligação à proteína não estrutural 5 (NS5) e a proteína do envelope (E), responsáveis e indispensáveis para o processo replicativo e entrada do vírus na célula. Dos 40 derivados analisados, os derivados FTs 32 e 39 foram capazes de se ligar à proteína NS5 e reduzir a carga viral quando as células receberam o tratamento após a infecção. Os derivados GQ402 e ZKC4 se ligaram a proteína E e reduziram a expressão de cópias de RNA viral, quando as células receberam um tratamento prévio à infecção. De acordo com nossos dados, encontramos indícios de novos potenciais agentes terapêuticos contra o ZIKV.

Palavras-chave: Tiazolidina-2-4-diona. Síntese Orgânica. Antivirais. ZIKV. *In silico*.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) has become a worldwide public health problem not only due to its capacity human dissemination and infection, but mainly due to its association with the development of neurological syndromes, which present a higher morbidity and mortality levels. The antiviral activity of thiazolidines (TZDs) already been described in the literature. The lack of specific treatment for infection, we propose evaluate new TZD derivatives as possible therapeutic agents against infection. There still no specific treatment for ZIKV infection, we propose to evaluate 40 new TZD derivatives as possible candidate therapeutic agents for the treatment of infection caused by the virus. After synthesis and characterization of the derivatives, GQs (103, 106, 138, 140, 393, 394, 396, 400, 402 e 403), JBs (3, 10, 16, 17, 18, 19, 23 e 24), ZKCs (1 – 10), ZKCE-1 e FTs (16, 19, 31, 32, 34, 35, 36, 38, 39 e 40) they were evaluated *in vitro* and *in silico*. *In vitro*, after screening for cytotoxicity and antiviral activity, the derivatives (GQ394, 396 and 402; ZKC2, 3, 4, 8 and 9; JB3 and FTs 32 and 39) stood out and evaluated for their ability to reduce the number of copies of viral RNA in Vero cells pre and post ZIKV infection. The other derivatives proved to be toxic to the cell and had no action against the virus, so they not selected for further tests. Molecular docking was performed to assess whether the derivatives would have the ability to bind to non-structural protein 5 (NS5) and envelope protein (E), responsible and indispensable for the replicative process and entry of the virus into the cell. Of the 40 derivatives analyzed, derivatives FTs 32 and 39 were able to bind to NS5 protein and reduce viral load when cells received treatment after infection. Derivatives GQ402 and ZKC4 bind to protein E and reduced the expression of viral RNA copies when the cells received treatment prior to infection. According to our data, we found evidence of potential new therapeutic agents against ZIKV.

Keywords: Thiazolidine-2-4-dione. Organic Synthesis. Antivirals. ZIKV. In silico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa da disseminação global do ZIKV.....	19
Figura 2 –	Representação esquemática da partícula viral	21
Figura 3 –	Estrutura geral da poliproteína viral codificada pelo ZIKV....	22
Figura 4 –	Ciclo replicativo do ZIKV.....	25
Figura 5 –	Ciclo de transmissão do ZIKV.....	26
Figura 6 –	Diferença entre o crânio de um recém-nascido normal e com microcefalia.....	28
Figura 7 –	Via de Sinalização do IFN-I (A) e via de indução do INF-I...	30
Figura 8 –	Sítios de mecanismos de ação de antivirais.....	31
Figura 9 –	Estrutura do anel tiazolidínico.....	35
Figura 10 –	Ensaio experimental pós infecção com o ZIKV.....	52
Figura 11 –	Ensaio experimental pré infecção com o ZIKV.....	53
Figura 12 –	Expressão do RNA viral na presença dos derivados GQ pós infecção.....	57
Figura 13 –	Expressão do RNA viral na presença dos derivados ZKC pós infecção.....	59
Figura 14 –	Expressão do RNA viral na presença do derivado JB3 pós infecção.....	60
Figura 15 –	Expressão do RNA viral na presença dos derivados FT pós infecção.....	60
Figura 16 –	Expressão do RNA do ZIKV na presença da cloroquina após infecção.....	61
Figura 17 –	Expressão do RNA viral quando as células foram previamente tratadas com os derivados GQ.....	62
Figura 18 –	Expressão do RNA viral quando as células foram previamente tratadas com os derivados ZKC.....	63
Figura 19 –	Expressão do RNA viral quando as células foram previamente tratadas com o derivado JB3.....	64

Figura 20 –	Expressão do RNA viral quando as células foram previamente tratadas com o derivado FT.....	64
Figura 21 –	Expressão do RNA viral quando as células foram previamente tratadas com cloroquina.....	65
Figura 22 –	Interações intermoleculares entre os resíduos do sítio da proteína E e os derivados JB17, FT35, JB16 e ZKC9.....	66
Figura 23 –	Interações intermoleculares entre o derivado ZKC-4 e a proteína E.....	67
Figura 24 –	Interações intermoleculares entre os resíduos do sítio ativo da NS5-RdRp e os derivados.....	68
Figura 25 –	Interações intermoleculares entre os resíduos do sítio ativo NS5-MTase O'-2 e os derivados.....	69
Figura 26 –	Interações intermoleculares entre os resíduos do sítio ativo NS5-MTase N-7 e os derivados.....	70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 –	Dados referentes aos compostos GQ.....	38
Quadro 2 –	Dados referentes aos compostos ZKC.....	41
Quadro 3 –	Dados referentes aos compostos JB.....	43
Quadro 4 –	Dados referentes aos compostos FT.....	45
Tabela 1 –	Valores de CC ₅₀ , IC ₅₀ e IS dos derivados promissores.....	55
Tabela 2 –	Valores de CC ₅₀ , IC ₅₀ e IS dos demais derivados.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Proteína do Capsídeo
DC-SIG	Receptor da fosfatidilserina
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DENV	Vírus Dengue
E	Proteína do Envelope
EGCG	(-)-galato-epigallocatequina.
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFNAR1	Receptores de Interferon-I
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon- <i>gama</i>
IRF-3	Fator Regulador do Interferon 3
Mtase	Metil-transferase
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NF-kB	Fator nuclear kappa-B
NK	Células Natural Killer
NPC	Células Progenitoras Neurais
NS	Proteínas não estruturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
ORF	<i>Fase Aberta de Leitura</i>
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PMA	Forbol 12-Miristato 13-Acetato
PPARY	Proliferadores de peroxissoma gama
PRM	Proteína precursora de membrana
RDRP	RNA polimerase dependente de rna
RIG-1	Receptor de Reconhecimento de Padrão citosólico.
RT-QPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa por Transcrição Reversa
SCZ	Síndrome congênita do zika vírus
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SFB	Soro Fetal Bovino
SI	Sistema imune
SGB	Síndrome de Guillain Barré
STAT	Fatores de transcrição denominados STATs (transdutores de sinal e ativadores de transcrição)
TAM	Receptor da fosfatidilserina
TZD	Tiazolidinodionas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VERO	Célula de morfologia epitelial, originária de rim de macaco
ZIKV	Zika Vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivos	18
1.1.2	Geral	18
1.1.3	Específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	História e Epidemiologia do ZIKV.....	19
2.2	Estrutura e Genoma viral.....	21
2.3	Ciclo Replicativo do ZIKV.....	24
2.4	Transmissão e Patogênese.....	25
2.5	ZIKV e o Sistema Imune.....	29
2.6	Tratamento.....	31
2.7	Docking Molecular.....	34
2.8	Tiazolidinadionas.....	35
3	METODOLOGIA	38
3.1	Síntese e Caracterização dos Derivados	38
3.2	Docking molecular dos derivados.....	47
3.3	Local da Experimentação <i>in vitro</i>	48
3.4	Manutenção celular.....	48
3.5	ZIKV	48
3.5.1	Identificação da amostra viral.....	48
3.5.2	Produção do estoque viral.....	49
3.5.3	Titulação do estoque viral.....	49
3.6	Ensaio de citotoxicidade.....	50
3.7	Atividade antiviral.....	51
3.8	Determinação do índice de seletividade.....	51
3.9	Tratamento com os derivados TZDs pós infecção.....	51
3.10	Tratamento com os derivados TZDs pré infecção.....	52
3.11	Extração de RNA.....	53
3.12	Redução do número de cópias virais por RT-qPCR.....	53
3.13	Análise Estatística.....	53
3.14	Aspectos Éticos.....	54

4	RESULTADOS	55
4.1	CC ₅₀ , IC ₅₀ e IS.....	55
4.2	Redução do número de cópias de RNA viral	57
4.2.1	Tratamento pós infecção.....	57
4.2.2	Tratamento pré infecção.....	61
4.3	Docking molecular.....	65
4.3.1	Ligação dos derivados à proteína E.....	65
4.3.2	Ligação dos derivados à proteína NS5.....	67
4.3.2.1	RdRp.....	67
4.3.2.2	MTase 2'-O.....	68
4.3.2.3	MTase N-7.....	69
5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÃO.....	75
7	PERSPECTIVAS.....	75
8	REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO A –	ARTIGO 1 – NEW TZDS SHOW ACTIVITY AGAINST ZIKA VIRUS IN VITRO	93

1. INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas causadas por vírus emergentes e reemergentes como dengue, chikungunya, febre amarela, entre outros, representam um grande problema de saúde pública mundial (Yasuhara-Bell et al., 2010). Várias destas infecções ainda não apresentam tratamento específico, apenas sintomático (Cos et al., 2006).

Dentro desse grupo de vírus causadores de infecções virais em humanos e sem terapia antiviral específica, temos o Zika Vírus (ZIKV). Membro da família *Flaviviridae*, originado do continente Africano, o ZIKV tem como vetor central o mosquito do gênero *Aedes* em diversas espécies. No Brasil a preocupação concentra-se sobre a espécie *Aedes aegypti*, comum na região e também vetor dos vírus dengue, febre amarela e chikungunya (HAMEL et al., 2015).

Apresentando um quadro clínico leve e autolimitado na grande maioria dos acometidos, a infecção pelo vírus também pode levar a síndromes neurológicas graves, tais como a síndrome congênita do ZIKV (SCZ) e a síndrome de Guillain Barré (SGB). Em 2015, houveram 3530 (121,7 por 100 mil nascidos vivos) casos suspeitos de microcefalia relatados, incluindo 46 óbitos, principalmente em Pernambuco, estado que concentrava 35% do total de casos suspeitos (OPAS, 2016). Apesar da redução do número de casos, dados do boletim epidemiológico até a semana epidemiológica (SE) 21, mostram que novos casos continuaram sendo registrados em 2020. Em 2019, 55 casos de microcefalia foram registrados, dos quais 3 evoluíram para óbito (BE, 2019).

Em termos gerais o mecanismo de transmissão do ZIKV, ocorre após o repasto sanguíneo do mosquito quando o vírus é transferido para o homem, iniciando o processo de infecção. Após a inoculação viral, ocorre a interação da partícula viral com receptores do hospedeiro, seguida pela liberação do material genético viral no citoplasma celular. Nos ribossomos é feita a tradução das proteínas virais e formação de novas fitas de RNA, finalizando o processo replicativo. Após a montagem das novas partículas virais, estas são liberadas da célula (SMIT, 2010; KNIPE et al., 2013). No Sistema Imune (SI) o ZIKV é capaz de suprimir a resposta imune antiviral devido à interação de algumas de suas proteínas não estruturais (NS) com proteínas das vias de sinalização e de indução de interferon tipo I (IFN- α/β), principais vias no estabelecimento do estado antiviral (CAO-LORMEAU et al., 2014; KUMAR et al., 2016).

Até o momento não existe um tratamento específico para infecção causada pelo ZIKV. As autoridades de saúde de todos os países que apresentaram ocorrências do vírus em sua população, por enquanto, recomendam o tratamento sintomático (OPAS, 2020). Nessa vertente

muitos grupos de pesquisa em todo o mundo buscam o desenvolvimento de novos agentes com maior especificidade para o vírus.

Nessa perspectiva, as tiazolidinedionas (TZDs), também conhecidas como glitazonas, podem representar uma ferramenta promissora para o tratamento e/ou profilaxia da infecção pelo ZIKV. As TZDs são ligantes agonistas do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR γ), um receptor nuclear que regula a ativação de uma série de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e no processo inflamatório. Estudos realizados após a descoberta das TZDs, mostraram uma série de ações biológicas desenvolvidas por esses fármacos, como atividade anti-inflamatória (PRABHAKAR et al., 1998), antimalárica (SUNDURU et al., 2009), antioxidante (REDDY et al., 1998), antitumoral (HAFEZ et al., 2009), antimicrobiana (BONDE et al., 2004), antiproliferativa (AMARNATH et al., 2004) e antiviral (JADAV et al., 2015). Alguns estudos utilizando TZDs mostraram sucesso na redução da carga viral contra os vírus da dengue, chikungunya e vírus da hepatite B (GANGULY et al., 2010; WAKUI et al., 2010; JADAV et al., 2015).

Devido à ausência de estratégias profiláticas e terapêuticas que ajudem a diminuir os casos de infecção pelo ZIKV, esse estudo se propôs a sintetizar 40 novos derivados tiazolidínicos e avalia-los tanto in vitro quanto in silico. Um *screening* inicial para validar os derivados quanto a sua citotoxicidade e atividade antiviral foi realizado. Nessa etapa, 11 derivados não foram tóxicos para as células e se mostraram seletivos para o vírus, dessa maneira foram selecionados para serem avaliados quanto a sua potencial capacidade de reduzir o número de cópias de RNA viral pré e pós infecção. Em paralelo os 40 derivados foram avaliados através da técnica de docking molecular quanto a sua capacidade de ligação às proteínas essenciais para o processo de entrada do vírus na célula hospedeira (proteína E) e para o processo replicativo (proteína não estrutural 5 – NS5).

O presente trabalho mostra resultados de novos derivados tiazolidínicos como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento e profilaxia da infecção pelo ZIKV.

1.1 Objetivos

1.1.2 Geral

Avaliar a atividade antiviral de novos derivados tiazolidínicos contra o vírus Zika *in vitro* e *in silico*.

1.1.3 Específicos

- Síntese e caracterização de novos derivados TZDs
- Determinar a citotoxicidade e a atividade antiviral dos derivados
- Investigar se os novos derivados TZDs são capazes de reduzir a replicação do ZIKV *in vitro*
- Avaliar se os novos derivados TZDs inibem a entrada do ZIKV em células infectadas
- Investigar *in silico* os possíveis mecanismos de ação dos derivados promissores

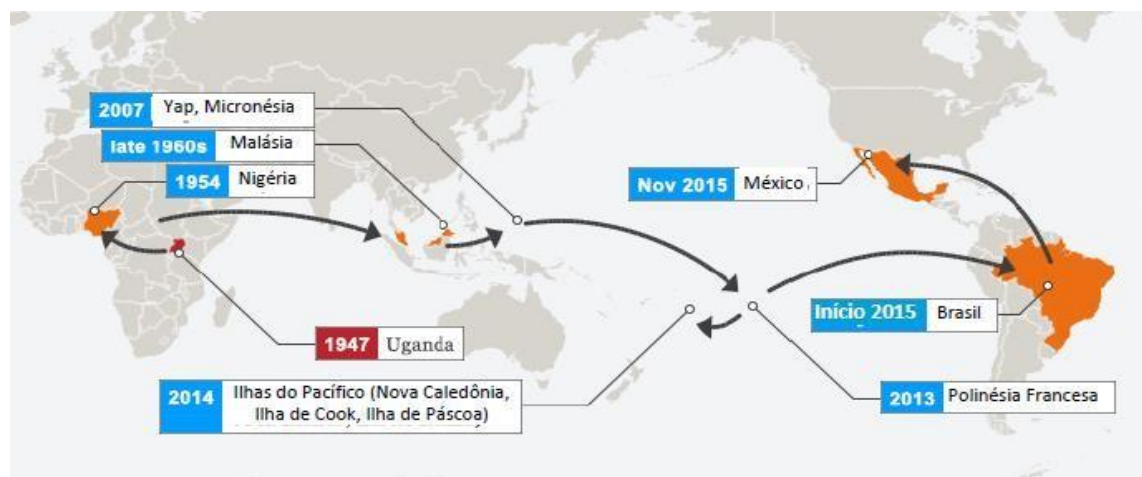
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 História e Epidemiologia do ZIKV

O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez na Floresta de ZIKA na Uganda – África, a partir de um macaco Rhesus sentinela em 1947. Casos de infecção pelo ZIKV em humanos foram descritos pela primeira vez em 1954 na Nigéria. Estes foram esporádicos por meio século antes de o vírus emergir no Pacífico e nas Américas (FAYE et al., 2014).

Durante décadas o vírus permaneceu endêmico apenas na África e na Ásia (JUNIOR et al., 2015). Anos depois o vírus ressurgiu, só que dessa vez em locais sem histórico prévio da infecção. Em 2007, ocorreu o primeiro registro de surto pelo ZIKV na ilha YAP, uma das ilhas que compõe o arquipélago da Federação dos Estados da Micronésia, atingindo 73% da população (CAO-LORMEAU et al., 2014; SONG et al., 2017). O segundo surto registrado ocorreu em 2013/2014, no leste da Polinésia Francesa com uma estimativa de 30.000 infecções sintomáticas (MUSSO, CAO-LORMEAU., 2014; MALLET, MUSSO., 2013). Essas epidemias foram seguidas por surtos menores no Pacífico em 2014 na Nova Caledônia (PROMEDMAIL, 2014), nas Ilhas Cook (OMS, 2014) e na Ilha de Páscoa (PROMEDMAIL, 2014) e em 2015 em Vanuatu (PROMEDMAIL, 2015), nas Ilhas Salomão (CDC, 2015), Samoa (NHAN, MUSSO., 2015) e Fiji (CDC, 2015). Em 2015, o ZIKV surgiu pela primeira vez nas Américas e, a partir do final de janeiro de 2016, a circulação autóctone do ZIKV foi relatada em mais de 20 países ou territórios nas Américas do Sul, Central e do Norte e Caribe (CDC, 2015; CAMPOS et al., 2015; ENFISSI et al., 2016; HENESSEY et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Mapa de disseminação global do ZIKV. Fonte: Universidade de Lancaster, Journal of General Virology. Adaptado pela autora



Ainda não está claro o momento exato em que o vírus entrou no Brasil. Entre as hipóteses mais frequentes são de que a entrada do ZIKV poderia ter ocorrido durante a Copa do mundo em 2014 ou um pouco mais tardiamente, em janeiro de 2015 durante a corrida das canoas do Va'a World Sprint Champion ship, com a presença marcante de atletas residentes de regiões endêmicas para o ZIKV (ZANLUCA et al., 2015; MUSSO, 2015). Em 2016, um grupo de pesquisadores dos institutos Evandro Chagas e Adolfo Lutz e da Fundação Oswaldo Cruz sugeriram que a disseminação no país possivelmente começou em algum momento entre os meses de maio e dezembro de 2013, período que coincide com a realização da Copa das Confederações e o aumento no trânsito de pessoas pelo país, entre elas residentes da polinésia Francesa (região afetada pelo vírus na mesma época) como a seleção do Taiti, por exemplo (SALVADOR, F. S, 2014; FARIA, N. R, 2016).

Entretanto, segundo o estudo *“Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics”* (Revisitando as principais rotas de entrada de arbovírus epidêmicos em humanos no continente americano por meio de Filogenômica de grande escala), os autores sugerem que a entrada do vírus no Brasil tenha ocorrido com a vinda de imigrantes ilegais vindos do Haiti e militares brasileiros em missão de paz naquele país no final de 2013. Esses resultados coincidem com estudos anteriores que haviam confirmado casos de chikungunya no Brasil importados do Haiti e da República Dominicana, tendo a América central e o Caribe como rotas para a introdução dos Arbovírus no Brasil. Além disso, a hipótese se sustenta pelo ancestral em comum do vírus seja uma cepa do Haiti. País que sofreu com a epidemia da Dengue, Zika e Chikungunya no mesmo período (CAMPOS et al., 2018).

No final de 2014 e início de 2015, um surto de “doenças exantemáticas” afetou milhares de pacientes no nordeste do Brasil, principalmente na Bahia, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Paraíba (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015). Alertas foram divulgados pelo Ministério da Saúde do Brasil e pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (OPAS, 2015) e em 15 de maio, foi confirmada a primeira febre do Zika na Bahia (CARDOSO et al., 2015). Em dezembro de 2015, 18 estados no Brasil confirmaram a transmissão autóctone do vírus nas regiões norte, nordeste, sudeste, centro-oeste e sul (HEUKELBACH et al., 2016) e o número estimado de casos suspeitos de infecção pelo ZIKV foi de 1.300.000 (SOLOMON; BAYLIS; BROWN, 2016).

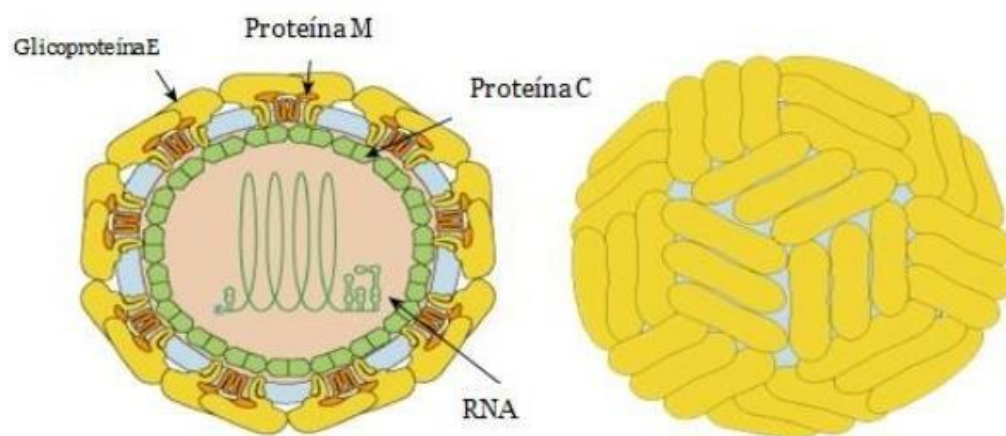
De acordo com o Ministério da Saúde, em 2016 foram registrados 216.207 casos prováveis de infecção pelo ZIKV. Em 2017, entre a semana epidemiológica (SE) 1 a 52, temos uma redução

no número de casos prováveis. Foram registrados 17.594 casos prováveis infecção, sendo 50% deles confirmados laboratorialmente e apenas 1 óbito foi confirmado laboratorialmente, demonstrando uma menor circulação do vírus no Brasil. Em 2018, até a SE 7, foram registrados 705 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país, com taxa de incidência de 0,3 caso/100 mil hab. destes, 117 (16,6%) foram confirmados, entretanto nenhum óbito pelo vírus foi confirmado (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018). Em 2020 até a SE 21, foram notificados 3.509 casos prováveis (taxa de incidência 1,7 casos por 100 mil habitantes) no país. A região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (3,6 casos/100 mil habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (2,5 casos/100 mil habitantes) e Norte (1,5 casos/100 mil habitantes). Até então não houve registro de morte associado ao ZIKV (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2020).

2.2 Estrutura e Genoma viral

A partícula viral do Zika é formada por um nucleocapsídeo icosaédrico, envolto por uma bicamada lipídica (envelope) onde estão inseridas duas glicoproteínas virais (proteínas E e M) (SHANKAR; PATIL; SKARIYACHAN, 2017). Em seu interior encontra-se o genoma viral, constituído por RNA de fita simples, não segmentado de polaridade positiva, com aproximadamente 11 Kb de comprimento (BARRETO-VIEIRA et al., 2016) (Figura 2).

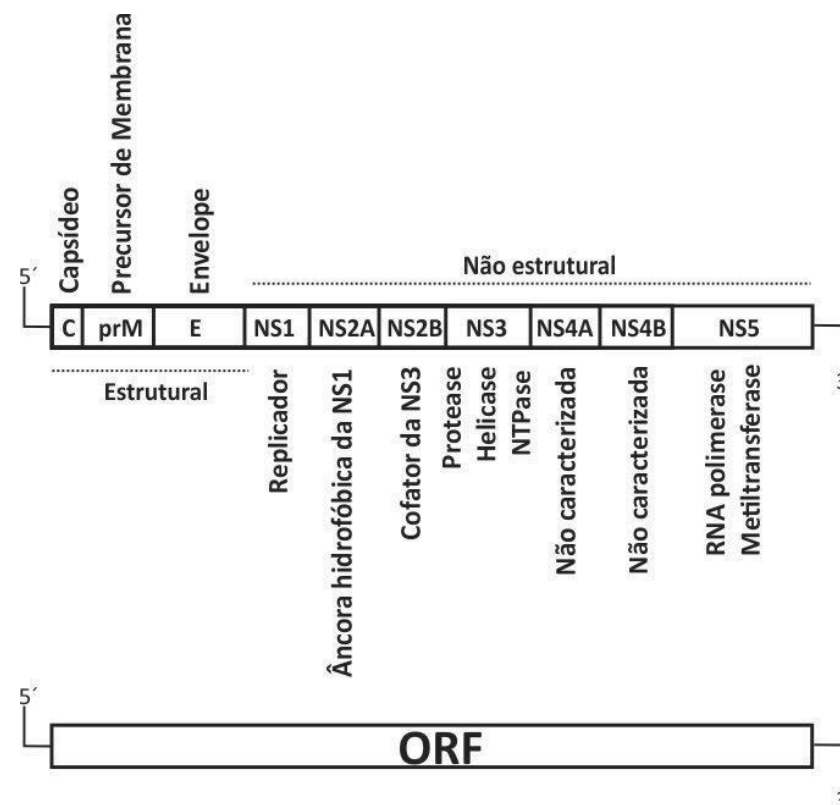
Figura 2 – Representação esquemática da partícula viral do Zika. Fonte: Kaushik et al, 2016. Adaptado pela autora.



O genoma do ZIKV possui uma única região aberta de leitura ORF (*"open reading frame"*-*"Fase Aberta de Leitura"*) que é traduzida em uma poliproteína de aproximadamente 3200

aminoácidos. Posteriormente, essa poliproteína é processada em três proteínas estruturais (capsídeo (C), pré-membrana (prM) e de envelope (E)) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 3). Juntas são responsáveis pelos processos de replicação, transcrição, tradução, montagem e liberação de novas partículas virais (KNIPE et al., 2013; FAYE et al., 2014; MARANO et al., 2016).

Figura 3 - Estrutura geral da poliproteína viral codificada pelo ZIKV. Fonte: KNIPE (2013). Adaptado pela autora.



As proteínas estruturais participam no ciclo de replicação do vírus e são denominadas como: proteína C, uma proteína pequena que encapsula o RNA viral; a proteína prM – posteriormente transformada na proteína de membrana (M) –; e por último, a proteína E. Estas duas últimas estão diretamente relacionadas com a entrada viral na célula hospedeira (SIROHI; KUHN, 2017). Além de mediar a interação vírus/célula hospedeira, a proteína E está envolvida em outras etapas do ciclo replicativo como o processo de fusão, penetração e tropismo celular (CHÁVEZ et al., 2010). As proteínas virais desempenham um papel importante nos processos de infecção e replicação do vírus. A glicoproteína E está associada à adsorção, internalização e fusão do vírus com a célula hospedeira, bem como ao desenvolvimento da imunidade humoral

neutralizante. A proteína prM tem várias funções no ciclo de vida dos *flavivírus*, como auxiliar na dobra mediada pelas chaperonas da proteína E e prevenir a fusão prematura durante a saída das novas partículas virais (BYRD et al., 2013). O principal papel da proteína C é a montagem e o armazenamento do genoma viral para formar o seu núcleo capsídeo, além de atuar como elemento da montagem de partículas virais (SAMSA et al., 2009).

Assim como as proteínas estruturais, as proteínas NS são responsáveis e indispensáveis para a correta replicação do RNA viral e também auxiliam na montagem viral e no escape da resposta imune do hospedeiro (DA SILVA NETO; WINTER; TERMIGNONI, 2013).

Embora ainda não se tenha uma total compreensão da função das proteínas NS dos *flavivírus*, sabe-se que a glicoproteína NS1 é necessária no processo de replicação do RNA viral e também está envolvida na resposta imune da célula hospedeira (ISSUR et al., 2009; DAFFIS et al., 2010). As proteínas NS2 (NS2A e NS2B) participam na síntese de RNA e montagem viral, além de estarem envolvidas em processos importantes como na evasão do vírus ao sistema imune, rearranjo da membrana e processamento da proteína NS1 (ZHENG et al., 2012; NEMÉSIO, PALOMARES-JEREZ; VILLALAÍN, 2013). A NS3 é uma proteína multifuncional, responsável pelo processamento da poliproteína em vários sítios dentro da região não-estrutural do genoma e tem NS2B como um cofator (BRECHER; ZHANG; LI, 2013; LI et al., 2015). As proteínas NS4 (NS4A e NS4B) são proteínas transmembrana hidrofóbicas, responsáveis pela organização da membrana levando à formação do complexo de replicação viral. A proteína NS5 é uma metil-transferase (MTase) N-terminal e uma RNA polimerase dependente de RNA C-terminal (RdRp) sendo fundamental para a síntese do RNA viral e replicação de novas partículas virais (ZHANG et al., 2016; ZHAO et al., 2017; FAJARDO SÁNCHEZ; GALIANO; VILLALAÍN, 2017).

Várias proteínas não estruturais têm sido estudadas como potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra *flavivírus*, assim como para o ZIKV. Dentre elas, a NS5 torna-se um alvo promissor devido ao seu papel vital na replicação viral, à sua atividade RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e por ela ser a proteína mais conservada em todo o gênero *Flavivirus*. Estudos já mostraram atividade dos compostos que se ligam à RdRp e inibem a replicação de vírus como o dengue e o ZIKV. Como não há enzima semelhante no hospedeiro, compostos que agem sobre a NS5 em geral são altamente seletivos, tornando-os atrativos para o desenvolvimento de antivirais (KOK WM, 2016; BYLER KG, OGUNGBE IV, SETZER WN, 2016; SAHOO M, JENA L, DAF S, KUMAR S, 2016; ZMURKO J et al, 2016; LIM SP et al, 2016).

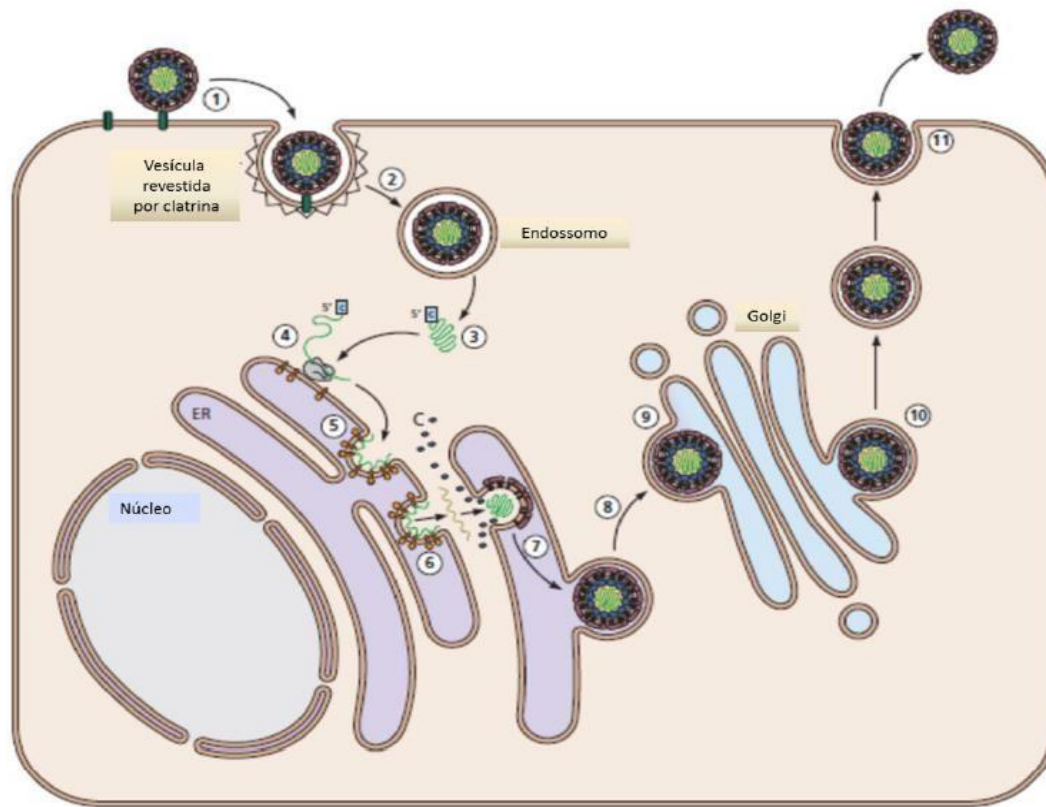
2.3 Ciclo Replicativo do ZIKV

Após o repasto sanguíneo do mosquito, o ZIKV entra em contato com a derme humana, invadindo diversos tipos celulares, como queratinócitos, fibroblastos e células dendríticas. A primeira etapa da infecção é a interação da glicoproteína E do envelope viral com receptores específicos do hospedeiro, como: DC-SIGN, TAM (AXL e Tyro3) conferindo maior suscetibilidade à infecção (LINDENBACH et al., 2013; HAMEL et al., 2015; MEERTENS et al., 2017).

A entrada do ZIKV na célula, ocorre pela fusão do envelope viral com o endossomo derivado da membrana da célula hospedeira (SAIZ et al., 2016). A célula hospedeira por sua vez, oferece um ambiente com pH ácido adequado para que após a entrada da partícula viral, ocorra o desnudamento do seu genoma. Com a liberação do material genético no citoplasma, a ORF é traduzida em uma poliproteína viral que é processada dando origem às proteínas virais. Essas proteínas formam o complexo replicativo, no qual irá ocorrer a síntese de um RNA de fita simples, polaridade negativa (3'-5') que por sua vez irá servir como molde para a produção de novas moléculas de RNA fita simples, polaridade positiva (5'-3') (LINDENBACH et al., 2013; HAMEL et al., 2015; BYLER; OGUNGBE; SETZER, 2016).

Esses novos RNAs servirão para traduzir proteínas e compor a nova progênie viral. Após a montagem e maturação das novas partículas virais, estas são transportadas por vesículas do complexo de *Golgi* e pela via secretora para fora da célula (SAIZ et al., 2016; SHANKAR; PATIL; SKARIYACHAN, 2017). Na via secretora da célula hospedeira, ocorre a maturação da partícula viral que é mediada pelo rearranjo das glicoproteínas virais e pela clivagem da porção pr da prM, através da furina formando os vírions maduros que são liberados para o ambiente extracelular, aptos a infectar novas células (LINDENBACH et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclo replicativo do ZIKV. (1) Ligação da partícula viral ao receptor de superfície celular. (2) Endocitose viral. (3) Fusão das membranas virais e celulares (4) Tradução da poliproteína viral (5) Sítio de replicação (6) Multiplicação do genoma viral (7) Sítio de montagem (8) Transporte das partículas virais imaturas pela via secretora. (9) Maturação da partícula viral (10) vírus maduro. (11) Liberação da partícula viral. Fonte: FLINT (2013). Adaptado pela autora.



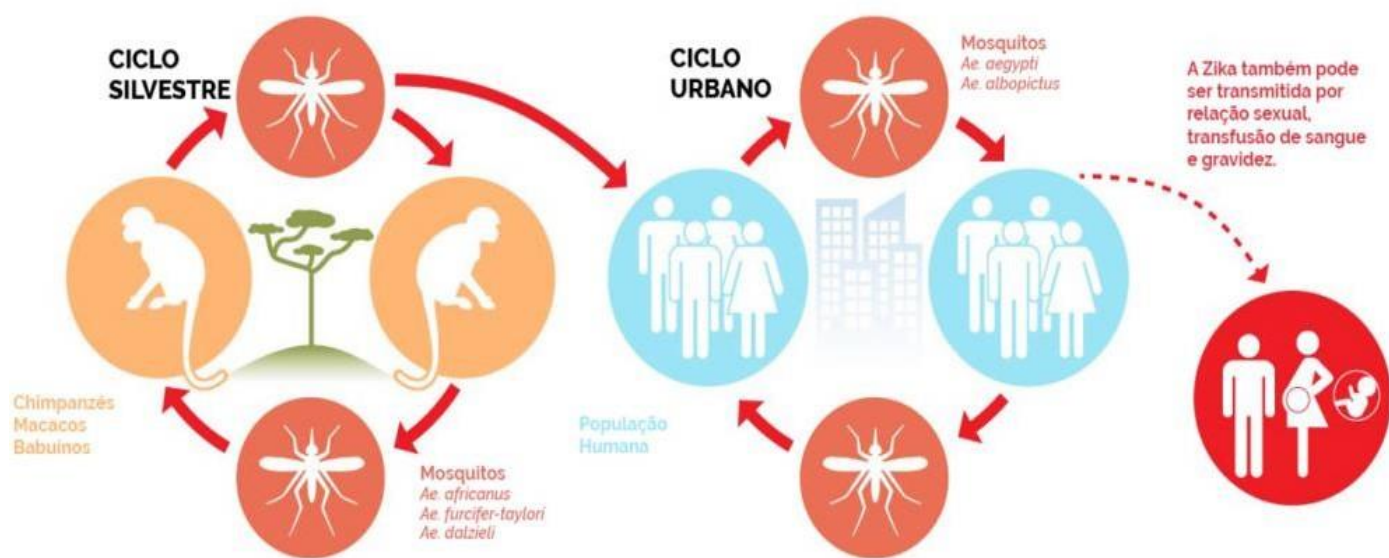
2.4 Transmissão e Patogênese

Desde a sua descoberta, o ZIKV tem sido referido como um vírus zoonótico de transmissão vetorial, ocasionada principalmente pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Aedes spp.*, que incluem *Aedes aegypti*, *A. albopictus*, *A. africanus* (primeira espécie da qual o vírus foi isolado), *A. luteocephalus*, *A. vitattus*, *A. furcifer*, *A. hensilii* e *A. apicoargenteus* (VINET; ZHEDANOV, 2010a). Entretanto, o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* foram detectados como vetores principais da linhagem asiática do ZIKV, responsável pela recente epidemia que atingiu mais de 70 países em todo o mundo (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017; GUERBOIS et al., 2016). Além das espécies citadas acima, o ZIKV também já foi isolado do *Culex quinquefasciatus*, porém estudos ainda estão sendo

realizados que comprovem que o mesmo seja capaz de transmitir a infecção (GUEDES et al., 2016).

Arbovírus tais como o ZIKV, apresentam dois ciclos de transmissão distintos, o ciclo silvestre, onde o vírus é mantido entre primatas não humanos e o vetor artrópode; e o ciclo urbano, envolvendo a transmissão viral entre os insetos vetores e humanos na cidade. No ciclo urbano, os seres humanos são os hospedeiros principais e junto com o mosquito mantém a circulação ativa do vírus (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; GUERBOIS et al., 2016; WEAVER; VASILAKIS, 2017). Estudos recentes têm mostrado que além do mosquito, outros veículos de transmissão devem ser considerados: como a transfusão sanguínea (MUSSO et al., 2014), transmissão sexual (MCCARTHY, 2016), transmissão transplacentária e perinatal (VENTURA et al., 2016), bem como o transplante de órgãos (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Ciclo de transmissão do ZIKV. Fonte: CDC. PLOS, Reuters. Adaptado pela autora.



Toda a população é passível de ser infectada, entretanto muitas pessoas infectadas com o vírus não manifestam sintomas (80%) ou apresentam apenas uma forma branda da doença. Em casos sintomáticos, os sintomas mais comumente reportados são: febre, exantemas, conjuntivite, mialgia e dor cefaleias com duração de 5-7 dias (CDC/EUA, 2016).

O surgimento do ZIKV foi associado a complicações neurológicas graves: síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos na Polinésia Francesa e microcefalia em neonatos no Brasil (CDC, 2016; OPAS, 2015). Devido a associação da infecção pelo ZIKV e os casos de má formação

congenita. Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde declarou a epidemia causada pelo ZIKV como um grave problema de saúde pública, colocando-o como uma emergência de caráter mundial (OMS, 2016).

Dentre a população de risco para a infecção estão as gestantes, uma vez que o vírus consegue atravessar a barreira placentária e infectar o feto, comprometendo o seu desenvolvimento cerebral (DRIGGERS et al., 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016; SOARES DE OLIVEIRA-SZEJNFELD et al., 2016). O maior risco ao feto se dá quando a mãe adquire a infecção no primeiro trimestre da gravidez, momento de formação fetal. O risco também existe, mesmo em nível menor, quando a virose é adquirida no segundo trimestre da gestação, ao passo que do terceiro trimestre adiante o risco de desenvolvimento de anormalidade cerebrais congênitas no feto é menor, já que o mesmo se encontra praticamente formado (BRASIL, 2015).

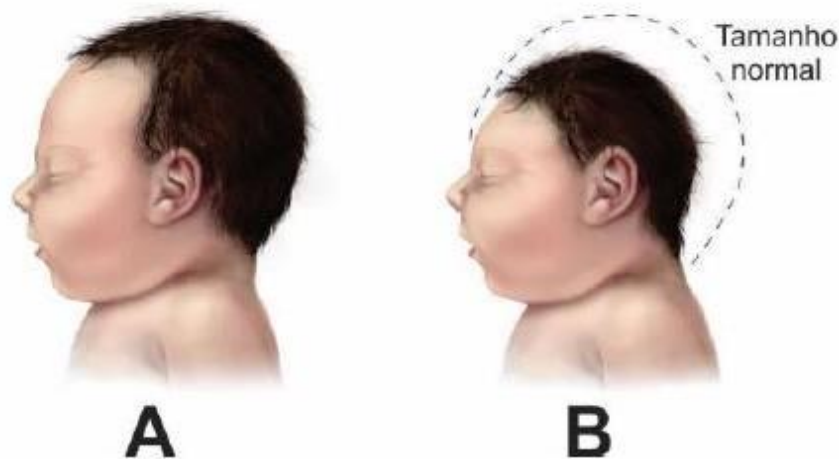
Hamlet et al. e Nowakowski et al., mostraram que o ZIKV é capaz de infectar fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas mediada por receptores específicos (HAMEL et al., 2015; NOWAKOWSKI et al., 2016). Além dessas células, o ZIKV também tem tropismo pelas células progenitoras neurais humanas (CPNHs), as quais apresentam grande permissividade à infecção. A infecção deste tipo celular desencadeia processos específicos, tais como apoptose, desregulação do ciclo celular, levando consequentemente ao impedimento da diferenciação celular das CPNHs, efeitos esses que contribuem para o desenvolvimento da Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ) (LI et al., 2016; TANG, 2016).

A SCZ caracteriza-se por alterações no crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos (RNs), que podem apresentar sintomas como: déficit auditivo, ocular e/ ou quadros mais graves como artrogripose e hidrocefalia (MARTINES et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016; VENTURA et al., 2016). A relação da SCZ com o desencadeamento de condições neurológicas tornou-se ainda mais evidente quando o RNA viral foi detectado no tecido cerebral de dois recém nascidos (RNs) e em tecidos placentários de 2 abortos. As mães relataram ter apresentado sintomas da infecção pelo ZIKV no primeiro trimestre da gravidez (MARTINES et al., 2016, OLIVEIRA MELO et al., 2016).

A microcefalia por sua vez é uma desordem neural na qual, a criança nasce com o perímetro cefálico reduzido (Figura 6). Diversas alterações podem ser observadas no SNC incluindo, atrofia cerebral acentuada, ventriculomegalia, calcificações intracranianas extensivas, padrão giral simplificado, disgênese do corpo caloso e hipoplasia cerebelar (DE OLIVEIRA et al., 2016; COSTA

et al., 2016; DE ONIS et al., 2004; MARTINES et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016). Esta condição leva à incapacidade motora, sensorial e cognitiva do portador (TANG, 2016).

Figura 6 - Diferença entre o crânio de um recém-nasido normal (A) e (B) Recém-nascido com microcefalia.
Fonte: CDC – EUA (2016). Adaptado pela autora.



Outra desordem neurológica associada à infecção pelo ZIKV foi a síndrome de Guillain-Barré, um distúrbio neurológico imune de progressão rápida que afeta principalmente adultos acima dos 30 anos. Esta síndrome caracteriza-se pela fraqueza dos membros inferiores, perda da habilidade motora, parestesia das extremidades, mialgia difusa, e em casos mais graves, apresentam-se com paralisia dos músculos respiratórios. Clinicamente, os pacientes apresentam as primeiras alterações neurológicas a partir do sexto dia pós-infecção tendo uma progressão rápida da doença (CRÉANGE, 2016; GOODFELLOW; WILLISON, 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016).

A primeira relação entre SGB e ZIKV surgiu em 2013, durante o surto viral na Polinésia Francesa, onde exames sorológicos de 42 pacientes com SGB demonstraram infecção pelo ZIKV (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Quando o vírus começou a circular no Brasil, a prevalência da SGB também apresentou um aumento justamente nas áreas de transmissão ativa do vírus (BROUTET et al., 2016; THOMAS et al., 2016). Além da SGB, outras patologias do sistema nervoso já foram identificadas em pacientes que viajaram ou vivem em regiões endêmicas para o ZIKV e que tem relatado sinais e sintomas clínicos da infecção, como é o caso da mielite e meningoencefalite aguda, entre outras (MÉCHARLES et al., 2016; CARTEAUX et al. 2016).

2.5 ZIKV e o sistema imune

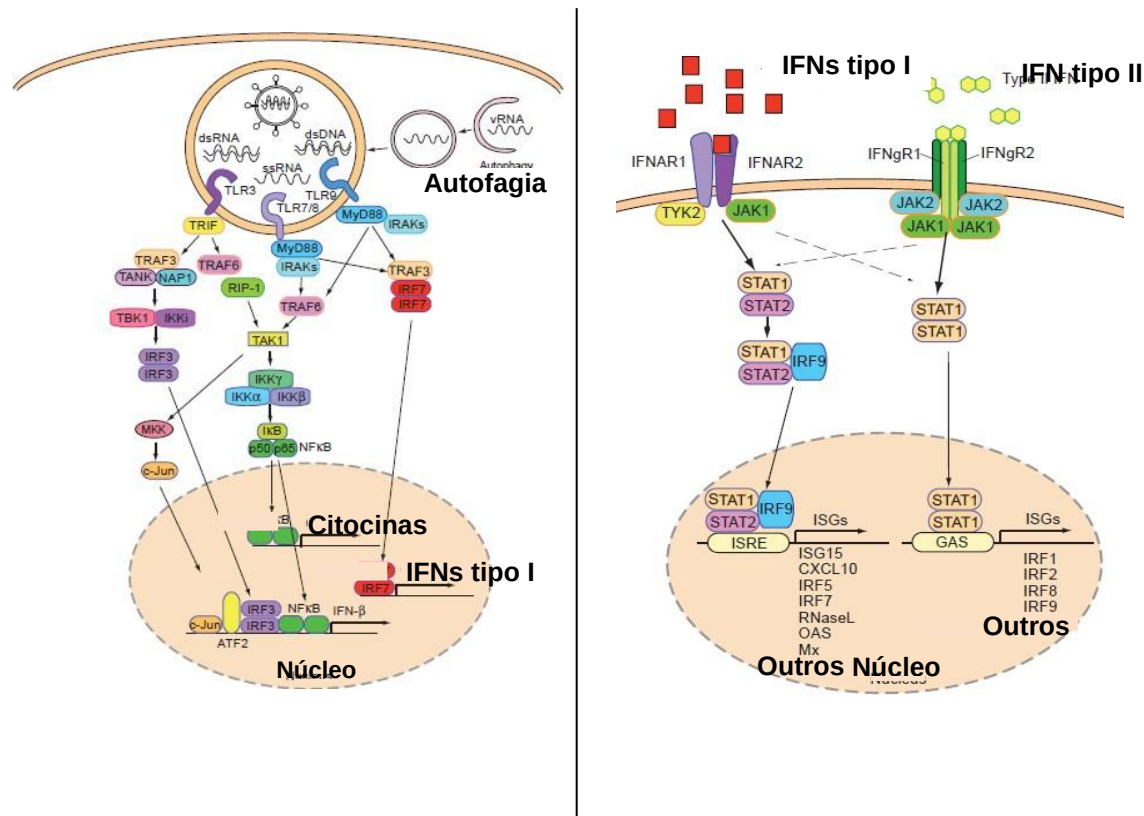
Durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV há um aumento dos níveis de citocinas associadas às células T auxiliares Th1 (IL-2), Th2 (IL-4, IL-13), Th9 (IL-9) e Th17 (IL-17), assim como das quimiocinas RANTES, MIP-1 α e VEGF. Tais citocinas e quimiocinas auxiliam o organismo a combater a infecção pelo ZIKV (MAHARAJAN et al, 2016).

Estudos *in vitro* utilizando amostras clínicas de pacientes na fase aguda e crônica da infecção com ZIKV, observaram que algumas citocinas como IL-6, IL-8 e IL-10 permanecem elevadas em ambas as fases da infecção. Além disso, pôde-se observar uma ativação polifuncional do SI, com algumas citocinas relacionadas a padrões de resposta Th1, Th2 e Th17 elevadas simultaneamente (HAMEL et al., 2015; TAPPE et al., 2015; FRUMENCE et al., 2016).

Apesar da eficiência do Sistema Imune (SI) os vírus usam de diversos mecanismos para evadir da resposta imune do hospedeiro, como por exemplo: utilizam a via do autofagossoma para aumentar a replicação viral, a adição do CAP pela NS5 dos flavivírus para inibir o reconhecimento do RNA viral pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) citosólicos, inibem a transcrição e/ou tradução da célula hospedeira ao interagirem com o fator de início da transcrição (TFIID) e com o fator de início da tradução (eIF4G), entre outros (LEE et al., 2008; DAFFIS et al., 2010; LINDENBACH et al., 2013).

O ZIKV age nas vias de sinalização e na via de indução do interferon (IFN), as quais são essenciais para o estabelecimento do estado antiviral e combate à infecção. A via de sinalização do IFN consiste no reconhecimento do genoma viral através de receptores celulares específicos. Como os receptores semelhantes a toll (TLR) que são expressos na superfície e nos endossomos das células e por receptores citosólicos tais como RIG-1 e MDA-5, que culminam na expressão de genes pró-inflamatórios, os quais são dependentes dos fatores de transcrição NF-kB e Fator Regulador do Interferon 3 (IRF-3). A interação entre o IFN do tipo I (IFN-I) e seus receptores (IFNAR1) expressos na superfície celular (atuação autócrina e parácrina) dá início a via de indução do IFN-I, que desencadeia a ativação da via JAK-STAT, essencial para a transcrição de mais de 300 genes estimulados por IFN (ISGs). A ativação dessa via leva à síntese de proteínas que induzem o estado antiviral, eliminando a infecção (LINDENBACH et al., 2013; KUMAR et al., 2016; FRUMENCE et al, 2016) (Figura 7).

Figura 7 – Via de Sinalização do IFN-I (A) e via de indução do INF-I. Fonte: Iwasaki; Medzhitov (2013) e adaptado pela autora



De acordo com Kumar et al., 2016, as proteínas NS1, NS4A e NS5 do ZIKV são capazes de bloquear as vias do IFN-I. A via de sinalização é bloqueada devido a supressão de IRF3 e NF-κB, enquanto que a via de indução é prejudicada pela interação do domínio MTase da NS5 com o STAT-2 promovendo a degradação do mesmo. Estudos *in vivo* em camundongos knockout *Ifnar1*^{-/-} e *Ifr3*^{-/-} *Ifr5*^{-/-} *Ifr7*^{-/-} mostraram a importância do IFN-I no combate a infecção com ZIKV, uma vez que esses camundongos apresentaram um percentual de 100% de morte e de sintomas graves da doença quando comparados a camundongos tipo selvagem. Além disto, foram detectados altos níveis do ZIKV no baço, fígado, rim, testículos, cérebro e coluna espinhal de todos os camundongos *Ifnar1*^{-/-} (DELVECCHIO et al., 2016; LAZEAR et al., 2016; KAMIYAMA et al., 2017).

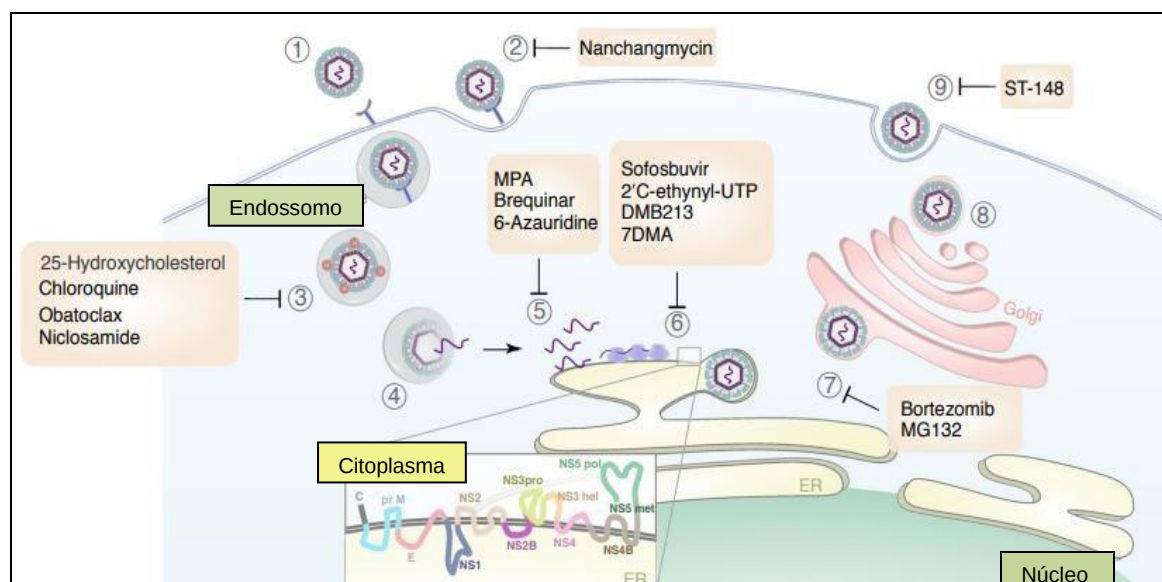
2.6 Tratamento

Como na maioria dos pacientes a infecção é autolimitada, o tratamento é sintomático e baseia-se no uso de medicamentos para controlar a febre e a dor, e em casos de coceira intensa, anti-histamínicos também são indicados (BASARAB et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Sendo assim, a busca por moléculas ativas com efeito profilático e/ou para o tratamento da infecção tem sido constante (ALAM et al., 2017; SAIZ; MARTÍN-ACEBES, 2017b). Como os vírus podem se aproveitar de vias metabólicas de seu hospedeiro é difícil encontrar fármacos que ajam de maneira específica para o combate a estes agentes.

Os antivirais são classificados de acordo com sua forma de ação, agindo nos alvos terapêuticos para intervir nas infecções como a do ZIKV. Dentro do processo de replicação viral, diferentes drogas podem atuar de maneiras distintas. Conhecidamente, drogas antivirais podem apresentar efeito de inibição da entrada viral (bloqueio de interação com o receptor celular – bloqueio da Adsorção), bloqueio da entrada viral, por exemplo através da inibição da fagocitose (Penetração) assim como através da inibição da liberação do capsídeo viral (bloqueio da Desnudação) (L. EYER et al., 2015; L. EYER et al., 2016; JULANDER et al., 2017).

A figura 8 apresenta uma visão geral do processo de replicação do ZIKV na célula infectada, mostrando as etapas da replicação que podem ser inibidas por alguns compostos.

Figura 8 - Sítios de mecanismos de ação de antivirais. Ciclo de vida infeccioso do ZIKV: o vírus é ligado (1) e subsequentemente internalizado (2) por endocitose mediada por receptor. O vírus é então transportado para os endossomos iniciais, onde o ambiente ácido induz a fusão (3) entre o vírus e a membrana do hospedeiro, resultando na desmontagem das partículas e na liberação do genoma (4). O RNA é replicado e traduzido em uma única poliproteína, que é processada por proteínas hospedeiras e codificadas por vírus (5). Após a tradução, um complexo de replicação é montado e associado a membranas induzidas por vírus, onde ocorre a replicação viral (6). As cadeias de RNA da progênie (+) podem iniciar um novo ciclo de tradução ou ser agrupadas em virions dentro do retículo endoplasmático (ER) (7). Os viriões imaturos resultantes são transportados para o Golgi, onde os viriões imaturos são transformados em partículas infecciosas maduras (8) que são liberadas por exocitose (9). Fonte: Mottin et al, 2018. Adaptado pela autora.



Diversos estudos têm sido conduzidos na tentativa de encontrar medicamentos que tenham atividade antiviral contra o ZIKV, abordando diferentes estratégias medicamentosas (CARNEIRO et al., 2016; JULANDER et al., 2017; MAKHLUF; KIM; SHRESTA, 2016; REZNIK; ASHBY Jr, 2017).

Shan et al. 2016, sugeriram a reutilização de drogas existentes, usadas para outras indicações clínicas, como potenciais candidatos para o ZIKV. No mesmo ano, um grupo de pesquisadores do Texas (USA), montou uma biblioteca com 774 medicamentos (antivirais ou não) já aprovados pelo FDA e avaliaram sua atividade contra o ZIKV em diferentes linhagens celulares, entre elas células humanas placentárias e células epiteliais amnióticas primárias. Dos 774 compostos testados, cerca de 20 tiveram a capacidade de reduzir a infecção pelo ZIKV (BARROWS et al., 2016). Este estudo sugere drogas que podem ser testadas por especialistas clínicos para infecção por ZIKV durante a gravidez ou no contexto de ZIKV grave.

A literatura mostra diversas drogas com resultados promissores contra o vírus. Entre elas, temos o Sofosbuvir, análogo do nucleotídeo uridina que quando biotransformado pelas células hepáticas em seu metabólito 7-deaza-2'-C-metiladenosina inibe a replicação e a transcrição do RNA viral. Ele tem sido usado junto com outras drogas no tratamento do HCV, e em ensaios com ZIKV foi capaz de inibir a replicação viral, além de diminuir a morbidade e a mortalidade em camundongos experimentalmente infectados (SOFIA, 2013; ZMURKO et al., 2016; REZNIK; ASHBY Jr, 2017).

A Cloroquina é uma droga antimalárica, conhecida por exibir um amplo espectro antiviral (AL-BARI, 2017). Estudos mostram que ela foi capaz de reduzir o número de células infectadas *in vitro*, inibir a produção viral, assim como preveniu a morte células promovida pela infecção por ZIKV. Além de reduzir a carga viral na placenta de camundongos C57BL/6 grávidas e infectadas pelo vírus (BROWNING, D.J, 2014; DELVECCHIO, R. et al., 2016; CAO, B. et al., 2017; BALASUBRAMANIAN, A. et al., 2017).

Adicionalmente, outras drogas vêm sendo testadas, entre estas destaca-se o epigallocatequina-galato (EGCG), um polifenol presente no chá verde e que foi capaz de inibir a entrada do ZIKV na célula alvo. Esses resultados levaram o grupo a acreditar que esta molécula atue inibindo a ligação do vírus com os receptores expressos nestas células (CARNEIRO et al., 2016). Um estudo computacional subsequente por Sharma e colaboradores, revelou que EGCG bloqueia a mudança conformacional durante o processo de fusão da membrana (SHARMA et al., 2017).

Além disso, a literatura tem mostrado a atuação de derivados de ácidos naturais e sintéticos como antivirais para diferentes tipos de vírus. Por exemplo, o ácido rosmarínico (AR), um potente anti-inflamatório encontrado em diversas ervas *Labiatae*, reduziu a mortalidade de camundongos infectados com o vírus da Encefalite Japonesa em torno de 20% quando comparado ao grupo infectado e não tratado. O tratamento com AR inibiu completamente a expressão de proteínas virais e reduziu significativamente os transcritos de RNAm viral (SWARUP et al., 2007).

Merino Ramos e colaboradores descreveram as propriedades antivirais do ácido Nordihydroguaiarético (NDGA) (hipolipemiante com ações antioxidantes e anti-inflamatórias) e seu derivado Tetra-O-Metil Nordihydroguaiarético no ciclo replicativo do WNV e ZIKV (MERINO-RAMOS et al., 2017). Em estudos anteriores, o ácido Nordihydroguaiarético também mostrou atividade na replicação viral do DENV e HCV, atuando na remoção de lipídios essenciais para replicação viral. O tratamento com NDGA também levou à redução no número de gotículas lipídicas (LDs), as organelas de armazenamento de lipídios neutros envolvidos na morfogênese do DENV que são conhecidas por aumentarem em número durante a infecção (SOTO-ACOSTA et al., 2014; SYED; SIDDIQUI, 2011).

O estudo com o reposicionamento de drogas ou o desenvolvimento de novas drogas deve levar em conta também o possível tratamento em gestantes. Fármacos já disponíveis no mercado ou em diferentes fases de estudo são inadequadas para uso na gravidez devido à toxicidade e / ou teratogenicidade. Por exemplo, a Azauridina é altamente tóxica para o feto. A ribavirina não é recomendada para uso na gravidez devido a efeitos embriotóxicos e teratogênicos. A niclosamida é um medicamento aprovado pela FDA, anteriormente designado na categoria B de gravidez e amplamente utilizado no tratamento de helmintíase intestinal. Drogas categoria B não foram submetidos a estudos controlados em mulheres grávidas, mas eles não conseguiram demonstrar um risco para o feto em estudos de reprodução animal. Além das gestantes e do feto, também é necessário considerar o tratamento de crianças (que podem ser infectadas após o nascimento) e a quantidade relativamente pequena de medicamentos aprovados pela FDA para o uso pediátrico (RASKA, ZEDECK, WELCH, 1966; KOCHHAR, PENNER, KNUDSEN, 1980; ENTRICAN, 2002).

2.7 Docking Molecular

Na incansável busca por agentes cada vez mais específicas ou para a descoberta de mecanismos de ação de novas drogas ou drogas já existentes, análises *in silico*, como o docking molecular ou modelagem molecular tem sido uma ferramenta bastante usada por diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. O docking molecular é um método preditivo para avaliar os possíveis ligantes de um alvo biológico ou farmacológico de interesse (MORRIS e LIM, 2008; DUAN et al., 2017). Ao determinar quais moléculas demonstram mais afinidade *in silico* pelo alvo farmacológico, é possível reduzir drasticamente o número de moléculas que serão sintetizadas e testadas (*in vitro* e *in vivo*) em laboratório e, assim, aumentar a capacidade de teste, com economia de tempo e recursos financeiros (DELANO, 2016).

O termo docking é proveniente da língua inglesa e significa atracar, ancorar ou acoplar, fazendo alusão ao fato das moléculas estudadas (ligantes) serem “ancoradas” tipicamente nas imediações do sítio ativo do alvo biológico ou farmacológico. Além do encaixe topológico, o docking determina se há interações favoráveis entre estas duas moléculas (ligante, ou candidato a fármaco, e receptor, ou alvo farmacológico), no intuito de elucidar as razões moleculares responsáveis pela potência farmacológica das mesmas (MORRIS e LIM, 2008; PERRYMAN et al., 2015). O procedimento de docking busca pela orientação que maximiza estas interações intermoleculares, por exemplo, minimizando a energia de interação do sistema. Assim, o ligante e o alvo farmacológico (tipicamente, uma proteína) formam um complexo por complementaridade estrutural e por estabilização energética (MENG et al., 2011).

Os métodos de docking se desenvolveram bastante nas últimas décadas. Para tais análises se torna necessária a estrutura tridimensional do receptor ou alvo farmacológico. Sendo assim, a estrutura tridimensional do receptor é determinada experimentalmente por cristalografia, normalmente usando-se difração de Raios-X (COSCONATI et al., 2010). O banco de dados RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) é o maior e mais confiável banco de dados de estruturas de proteínas (em sua maioria) e ácidos nucleicos, totalizando cerca de 121.414 depósitos (agosto de 2016). Uma questão adicional nos procedimentos de docking é o fato deles tipicamente considerarem o alvo rígido durante o cálculo, mesmo sabendo-se que eles podem possuir vários graus de liberdade conformacionais importantes como por exemplo, os grupos laterais dos resíduos de aminoácido em proteínas (TROTT e OLSON, 2010, DURRANT e MCCAMMON, 2011). Esta questão tem sido abordada pela geração mais moderna de programas

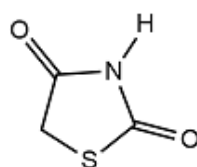
de modelagem molecular que consideram estes graus de liberdade do receptor durante os cálculos de docking, tentando-se obter resultados cada vez mais precisos ao mimetizar este “ajuste induzido” (“induced fit”) na modelagem *in silico* do processo farmacodinâmico da interação de um fármaco com o seu alvo farmacológico (KOSHLAND, 1958).

Sendo assim, com o auxílio dessa ferramenta diversos estudos conseguiram desenvolver e/ou elucidar novos agentes assim como, demonstrar o seu alvo terapêutico e consequentemente o seu mecanismo de ação. Fernando e colaboradores, por exemplo, através de modelagem de homologia e docking, previram dois compostos: ZINC33683341 e ZINC49605556. Estas duas moléculas ligam-se ao domínio de ligação ao glicano, inibindo a proteína E modificando a virulência do vírus (FERNANDO et al., 2016). Chelsea e colaboradores caracterizaram o modo de ação do composto ST-148 e viram que ele interage com a proteína da cápside, sendo um potente inibidor de todos os quatro sorotipos de DENV *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a viremia e a carga viral em órgãos vitais (CHELSEA et al., 2013). Dentre esses exemplos, alguns outros demonstram a importância e a funcionalidade que a abordagem *in silico* nos trazem (SIDDIQUI, 2011; SOTO-ACOSTA et al., 2014; CARNEIRO et al., 2016; SHARMA et al., 2017).

2.8 Tiazolidinadionas

As tiazolidinas-2,4-dionas (TZDs) (Figura 9) surgiram como uma nova classe de medicamentos para aliviar a resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2 no final de 1990.

Figura 9 - Estrutura do anel tiazolidínico.Fonte: Criado pela autora.



Demonstrou-se que as TZDs são ligantes análogos do receptor nuclear chamado Peroxissoma Proliferador Ativado Receptor-gama (PPAR γ). Esses receptores estão intimamente relacionados com os Receptores Retinóides (RXR) e agem a nível de transcrição nuclear, ou seja,

quando há a transcrição do código genético, fatores anti-inflamatórios são produzidos (BRAISSANT et al., 1996). Dentre suas funções, os TZDs controlam a diferenciação dos adipócitos, o metabolismo de ácidos graxos e altera a expressão de genes que também são regulados pelas insulinas, tornando seu uso assíduo no tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (NISSENS et al., 2007; FRÖHLICH et al., 2015).

Estudos realizados após a descoberta das TZDs, mostraram uma série de outras ações biológicas desenvolvidas por esses fármacos e seus derivados, como atividade anti-inflamatória (PRABHAKAR et al., 1998), antimalárica (SUNDURU et al., 2009), antioxidante (REDDY et al., 1998), antitumoral (HAFEZ et al., 2009), antimicrobiana (BONDE et al., 2004), antiproliferativa (AMARNATH et al., 2004) e antiviral (GANGULY et al., 2010).

A atividade anti-inflamatória assim como o potencial imunomodulador das TZDs e de seus derivados têm sido descritos em diversos estudos. O seu efeito agonista sobre o PPAR γ leva à inibição de fatores de transcrição importantes para a ativação e seguimento da resposta inflamatória, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs) (CONSOLI et al, 2005). O tratamento com rosiglitazona em modelos animais de inflamação aguda demonstrou diminuição na infiltração de células mononucleares e do exsudato inflamatório, bem como redução da formação de edema e de dano tecidual (CUZZOCREA et al, 2004).

Em macrófagos humanos isolados do sangue, TZDs reduziram a expressão de importantes genes pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e IL-1 β (JIANG et al, 1998). Estudos clínicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 tratados com TZDs demonstraram a capacidade destas moléculas de reduzir os níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios como proteína C reativa e metaloproteinases de matriz 1 e 9. Também foram observadas reduções na contagem de leucócitos circulantes e na concentração da citocina pró-inflamatória IL-6 (HAFFNER et al, 2002; MARX et al, 2003; MOHANTY et al, 2004).

Diferentemente da atividade anti-inflamatória que já vem sendo estudada há bastante tempo e já está bem estabelecida na literatura, a atividade antiviral das TZDs e de seus derivados têm sido descritos em alguns trabalhos. Huang et al. (2015) demonstraram em seu estudo que a rosiglitazona foi capaz de reduzir os níveis de moléculas inflamatórias que desempenham papéis chave na patologia do vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) em células endoteliais cerebrais vasculares humanas, sugerindo que essa TZD possui uma ação protetora contra os efeitos inflamatórios induzidos pelo HIV-1 (HUANG et al., 2015). Um outro estudo realizado,

mostrou que agonistas do PPAR γ apresentaram efeitos inibitórios sobre a adesão e migração de monócitos infectados pelo HIV através de células endoteliais cerebrais (RAMIREZ et al., 2008).

Além dos seus efeitos contra o HIV, Wakui e colaboradores (2010) demonstraram que a rosiglitazona apresentava efeito supressor dose dependente sobre a replicação do vírus da hepatite B (HBV). A TZD utilizada no estudo promoveu diminuição do DNA viral e dos intermediários replicativos em sobrenadante de cultura de células HepG2 (WAKUI et al., 2010).

Em 2015, Bahare et al realizaram modificações estruturais na posição 3 e 5 do anel tiazolidínico, gerando derivados com potente atividade inibitória da transcriptase reversa do HIV-1, antibacteriana (*Staphylococcus aureus* (NCIM 2122), *Bacillus subtilis* (MTCC 121), bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (MTCC118), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 647), *Salmonella typhi* (NCIM 2501), *Klebsiella pneumonia* (MTCC 3384) e fungo *Candida albicans* (MTCC 227), *Aspergillus niger* (NCIM 1056) e anti fungica (*Candida albicans*) (BAHARE et al., 2015).

Foi descrito na literatura por Jadav et al. (2015) a atividade de derivados tiazolidínicos contra o vírus chikungunya. Neste estudo, cinco compostos apresentaram ação antiviral *in vitro* em concentrações micromolar. O docking molecular realizado sugere que os compostos agem possivelmente inibindo a protease nsp2 do vírus chikungunya (JADAV et al., 2015).

Nitsche et al. (2013) e Manvar et al. (2015) descreveram na literatura a atividade de híbridos contendo o anel tiazolidínico. Os compostos testados no estudo se apresentaram como inibidores da RNA polimerase além de proteases do vírus da dengue, interferindo crucialmente na replicação do vírus (NITSCHKE et al., 2013; MANVAR et al., 2015).

De acordo com os dados da literatura, podemos observar que as TZDs, assim como seus derivados são uma promissora classe de fármacos para o tratamento de diversas classes de doenças. Relatos mostram a potencial ação antiviral dessas drogas, incluindo sobre arbovírus de RNA como o caso da dengue. Entretanto, poucos são os relatos sobre a atividade e o mecanismo de ação dessas drogas na infecção pelo vírus da zika.

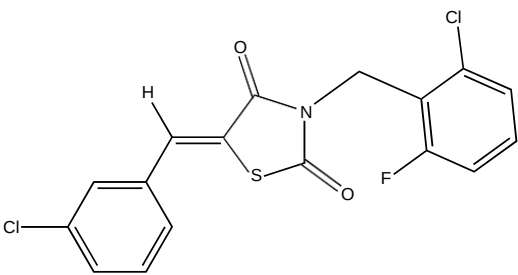
3 METODOLOGIA

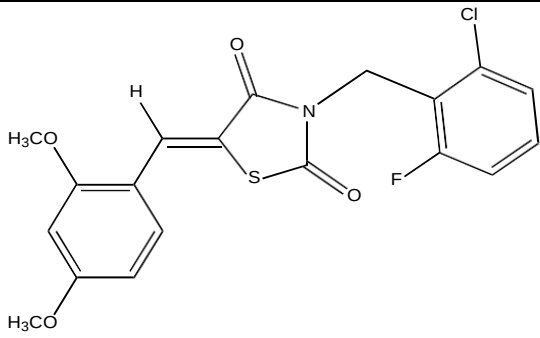
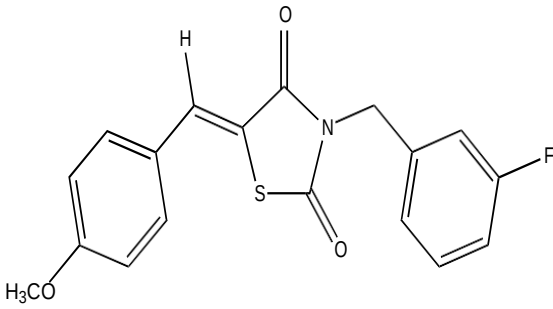
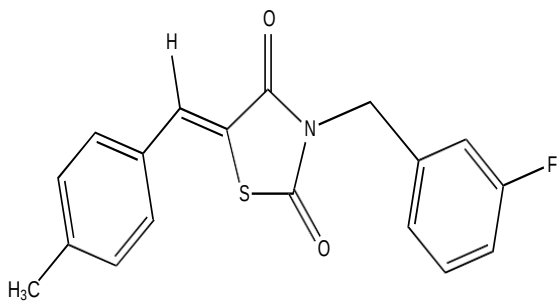
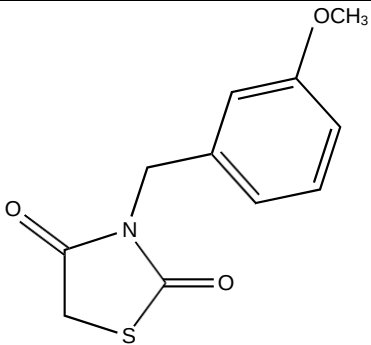
3.1 Síntese dos derivados

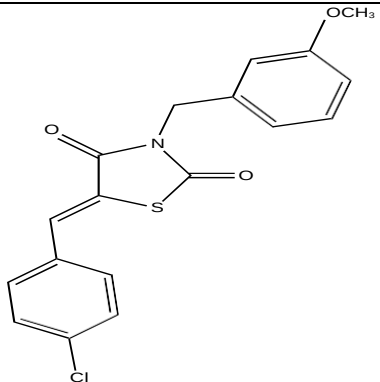
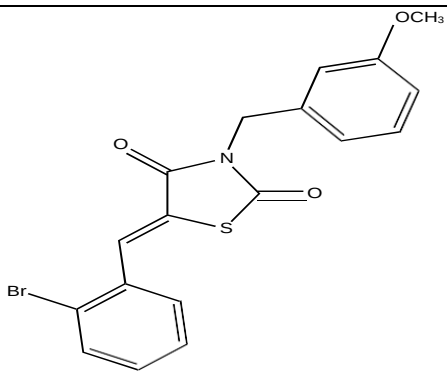
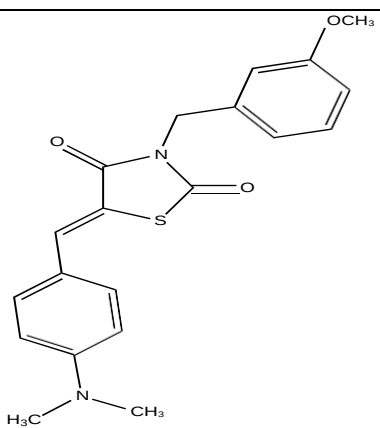
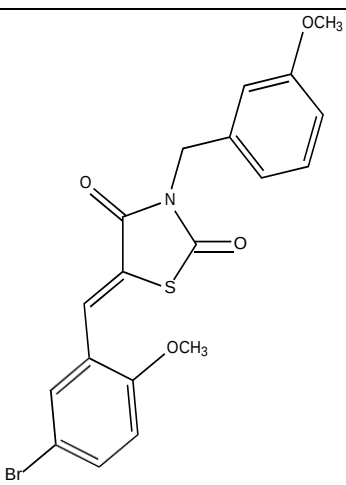
40 novos derivados foram sintetizados pelo laboratório de planejamento e síntese de fármacos – LPSF (Quadro 1) e em parceria com a Dra. Marina Pitta, nos foram cedidos para os testes *in vitro*. Os derivados da tiazolidina foram obtidos através de 3 etapas reacionais. Na primeira, a tiazolidina-2,4-diona (a) foi *N*-alquilada na presença de cloretos ou brometos aromáticos substituídos dando origem aos primeiros intermediários da tiazolidina substituída na posição 3 (b). Na segunda etapa, houve a formação dos ésteres cianoacetato de etila substituídos (d, LPSF IP's), formados a partir de aldeídos aromáticos. Na última etapa, os compostos LPSF IP's (d) reagiram com o intermediário *N*-alquilado (b) para formar os compostos finais, substituídos na posição 5 da tiazolidina-2,4-diona através de uma reação de adição de Michael. A tiazolidina-2,4-diona foi obtida em etapa prévia através de uma reação de ciclização entre a tiouréia e o ácido cloroacético. Os produtos finais foram purificados por lavagens sucessivas com água, solventes orgânicos ou por recristalização.

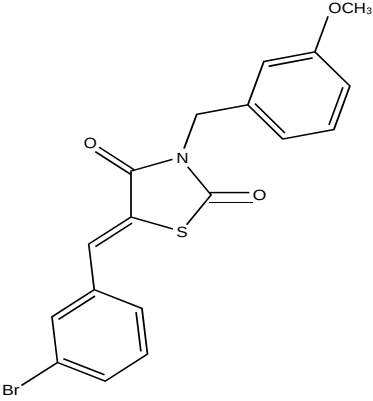
Os derivados seguiram a mesma rota de síntese citada acima, pertencendo todos à mesma classe, diferenciando entre si de acordo com os radicais adicionados. Os derivados estão divididos em 5 grupos (GQ, JB, FT, ZKC e ZKCE).

Quadro 1 – Dados dos derivados GQ. Fonte: Produzido pela autora.

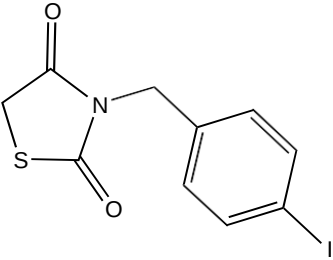
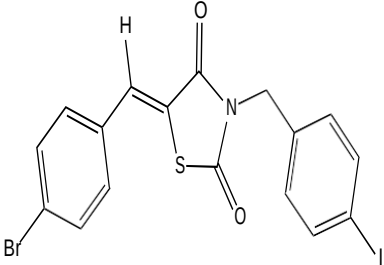
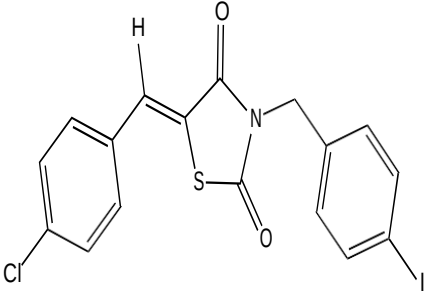
CÓDIGO	PESO MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA	NOME QUÍMICO
GQ103	382,24		5-(3-Cloro-benzilideno)- 3-(2-cloro-6-fluor- benzil)thiazolidina-2,4- diona

GQ106	407,84		3-(2-Cloro-6-fluor-benzil)-5-(2,4-dimetoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
GQ138	343,37		3-(3-Fluor-benzil)-5-(4-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
GQ140	327,37		3-(3-Fluor-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
GQ393	237,27		3-(3-metoxibenzil)tiazolidina-2,4-diona

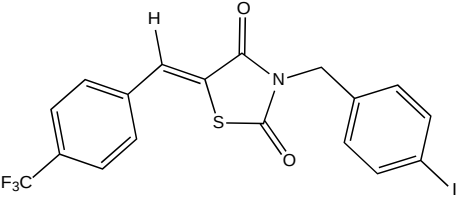
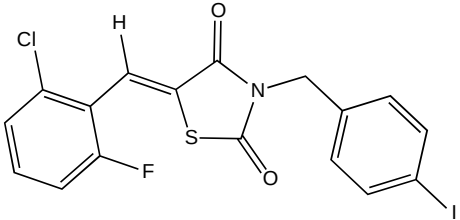
GQ394	359,83		5-(4-clorobenzilideno)-3-(3-metoxibenzil)thiazolidina-2,4-diona
GQ396	404,28		5-(2-bromobenzilideno)-3-(3-metoxibenzil)thiazolidina-2,4-diona
GQ400	368,45		5-(4-(dimetilamino)benzilideno)-3-(3-metoxibenzil)thiazolidina-2,4-diona
GQ402	434,30		5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-(3-metoxibenzil)thiazolidina-2,4-diona

GQ403	404,28		5-(3-bromobenzilideno)- 3-(3- metoxibenzil)thiazolidina- 2,4-diona
-------	--------	--	---

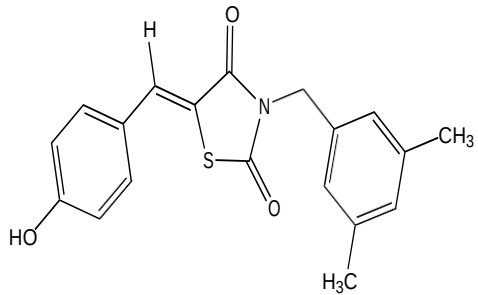
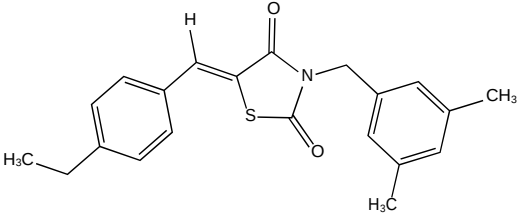
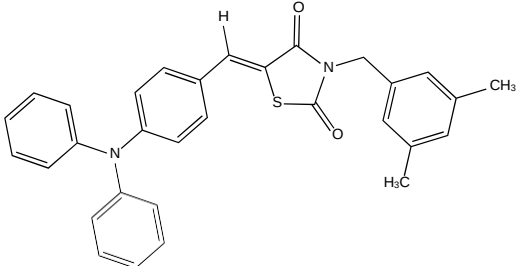
Quadro 2 – Dados dos derivados ZKC. Fonte: Produzido pela autora.

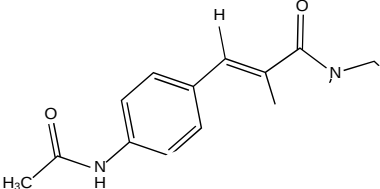
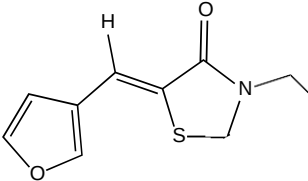
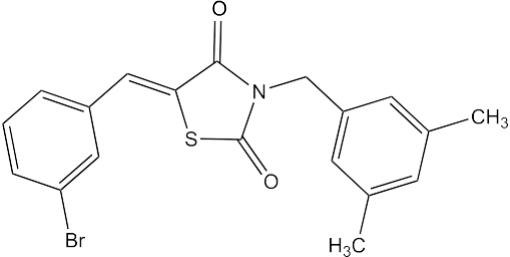
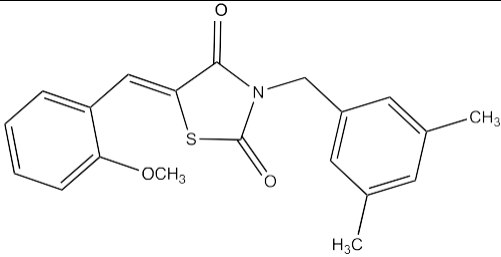
CÓDIGO	PESO MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA	NOME QUIMICO
ZKC-1	333,15		3-(4-iodobenzil)thiazolidina- 2,4-diona
ZKC-2	500,15		5-(4-bromobenzilideno)-3-(4- iodobenzil)thiazolidina-2,4- diona
ZKC-3	455,70		5-(4-clorobenzilideno)-3-(4- iodobenzil)thiazolidina-2,4- diona

ZKC-4	411,21		5-(furano-3-metileno)-3-(4-iodobenzil)thiazolidina-2,4-diona
ZKC-5	451,28		3-(4-iodobenzil)-5-(4-metoxibenzilideno)thiazolidina-2,4-diona
ZKC-6	435,28		3-(4-iodobenzil)-5-(4-metilbenzilideno)thiazolidina-2,4-diona
ZKC-7	464,32		5-(4-(dimetilamina)benzilideno)-3-(4-iodobenzil)thiazolidina-2,4-diona
KCE-1	337,37		3,3'-(piridina-2,6-dilbis(metileno))bis(thiazolidina-2,4-diona)
ZKC-8	530,17		5-(5bromo-2-metoxibenzilideno)-3-(4-iodobenzil)thiazolidina-2,4-diona

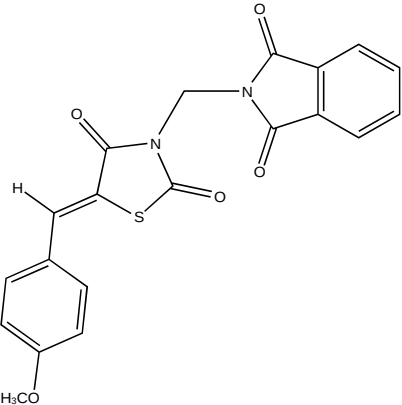
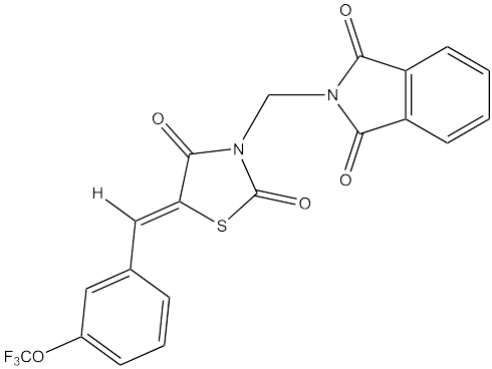
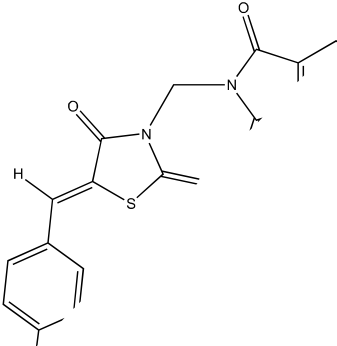
ZKC-9	489,25		3-(4-iodobenzil)-5-(4-(trifluorometil)benzilideno)thiazolidina-2,4-diona
ZKC-10	473,68		5-(2-cloro-6-fluorobenzilideno)-3-(4-iodobenzil)thiazolidina-2,4-diona

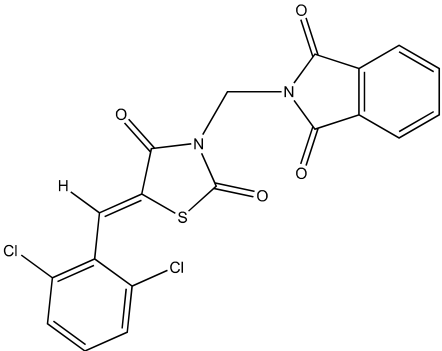
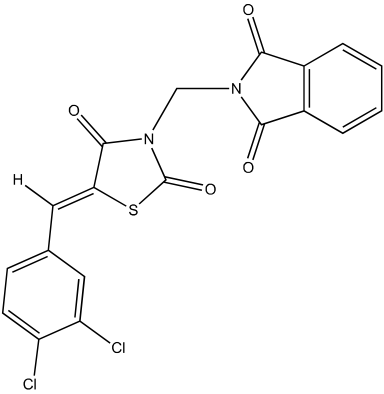
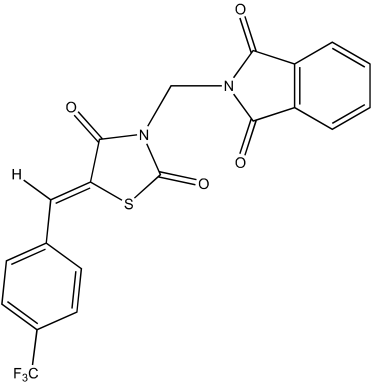
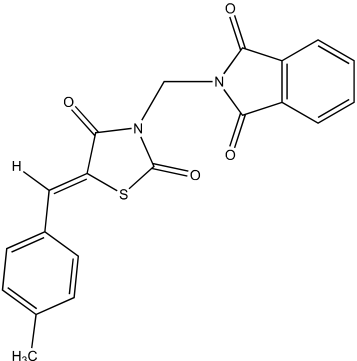
Quadro 3 – Dados dos derivados JB. Fonte: Produzido pela autora.

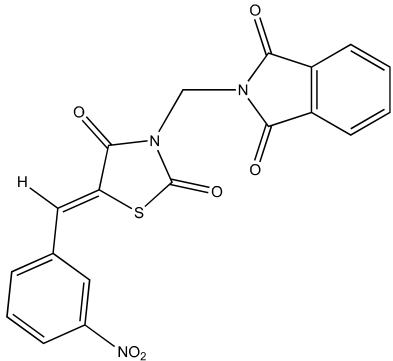
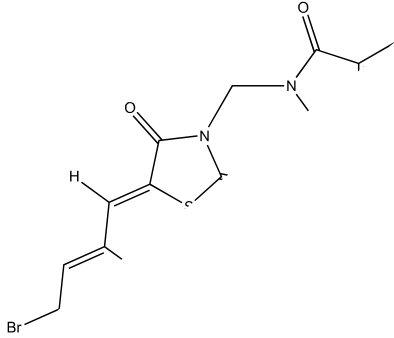
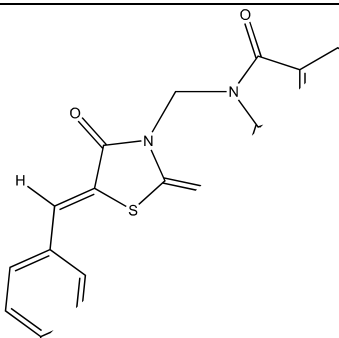
CÓDIGO	PESO MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA	NOME QUIMICO
JB 3	339,41		3-(3,5-dimetilbenzil)-5-(4-hidroxibenzilideno)thiazolidina-2,4-diona
JB10	351,46		3-(3,5-dimetilbenzil)-5-(4-etilenbenzilideno)thiazolidina-2,4-diona
JB16	490,62		3-(3,5-dimetilbenzil)-5-(4-(difenilamina)benzilideno)thiazolidina-2,4-diona

JB17	450,64		5-(4-(dibutilamino)benzilideno)-3-(3,5-dimetilbenzil)tiazolidina-2,4-diona
JB18	380,46		N-(4-(3-(3,5-dimetilbenzil)2,4-dioxotiazolidina-5-ilideno)metil)fenil)acetamida
JB19	313,37		3-(3,5-dimetilbenzil)-5-(furano-3-ilmetileno)tiazolidina-2,4-diona
JB23	402,30		5-(3-bromobenzidileno)-3-(3,5-dimetilbenzil)tiazolidina-2,4-diona
JB24	353,43		3-(3,5-dimetilbenzil)-5-(2-metoxibenzidileno)tiazolidina-2,4-diona

Quadro 4 – Dados dos derivados FT. Fonte: Produzido pela autora.

CÓDIGO	PESO MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA	NOME QUIMICO
FT16	394,40		3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(4-metoxibenzidileno)tiazolidina-2,4-diona
FT19	448,37		3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)—5-(3-(trifluorometoxi)benzidileno)tiazolidina-2,4-diona
FT31	382,37		3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(4-fluorobenzidileno)tiazolidina-2,4-diona

FT32	333,26		5-(2,6-diclorobenzidileno)-3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona
FT34	431,97		5-(3,4-diclorobenzidileno)-3-((1,3-dioxoisodolin-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona
FT35	432,04		3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(4-(trifluorometil)benzidileno)tiazolidina-2,4-diona
FT36	478,40		3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(4-metilbenzilideno)tiazolidina-2,4-diona

FT38	409,37		3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(3-nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona
FT39	473,30		5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-((1,3-dioxoisindolin-2il)metil)tiazolidina-2,4-diona
FT40	380,05		3-((1,3-dioxoisindolin-2-il)metil)-5-(4-hidroxybenzilideno)tiazolidina-2,4-diona

3.2 Docking Molecular dos derivados

As análises de Docking dos derivados foram realizadas em parceria com o professor Marcelo Zaldini Hernande, do departamento de Farmácia da UFPE. A modelagem molecular dos derivados foi realizada em duas proteínas do flavivírus ZIKV: proteína não estrutural 5 (**ZIKV-NS5**) e na proteína de envelope (**ZIKV-E**). A análise *in silico* dos derivados foi realizada paralelamente aos ensaios *in vitro*.

Embora existam diversas estruturas da proteína ZIKV-E disponíveis no banco de moléculas PDB (www.rcsb.org), nenhuma delas está complexada a um pequeno ligante co-cristalizado. A utilização de uma estrutura contendo o receptor (alvo farmacológico) e o ligante co-cristalizado é essencial por dois motivos: i) Permite determinar a região do sítio ativo com precisão e ii) Em alguns alvos biológicos, a conformação do sítio ativo pode estar “fechada” na ausência de um fármaco ou substrato, como ocorre na proteína de envelope do vírus da Dengue tipo 2 (MODIS et al., 2003), mantendo alguns resíduos de aminoácidos “enterrados” e inacessíveis durante o cálculo de docking molecular. Assim, optou-se por aplicar o método de modelagem por homologia utilizando a ferramenta SWISS-MODEL (swissmodel.expasy.org) para, desta forma, gerar um modelo da proteína ZIKV-E utilizando como “chassi” uma proteína homóloga cujo sítio ativo estivesse bem determinado e aberto. A sequência de aminoácidos foi obtida através do banco de moléculas PDB (Código PDB: 5JHM) e a estrutura escolhida para ser o chassi para o modelo da proteína ZIKV-E foi a proteína de envelope do vírus da Dengue tipo 2 (DENV2-E). As análises de docking na proteína NS5 utilizou-se a estrutura disponível no banco de moléculas PDB (Código PDB: 5WZ2).

Para cada posição, o sítio de ligação foi definido como todos os átomos dentro de 6.0 Å a partir do seu respectivo ligante co-cristalizado. Apenas as interações intermoleculares envolvendo os isômeros Z foram analisadas, uma vez que estes apresentaram uma melhor estabilidade energética e, por isso, trata-se do isômero que provavelmente pode ter sido sintetizado em maior concentração.

3.3 Local da Experimentação *in vitro*

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ-PE na Universidade Federal de Pernambuco/ UFPE.

3.4 Manutenção celular

As células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) Vero, foram mantidas em cultura utilizando meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, marca GIBCO™) por tempo indeterminado. Este meio foi suplementado com soro fetal bovino (SFB) (GIBCO™) na

proporção de 10%. Para prevenir a contaminação das culturas de células por bactérias, foi adicionado ao meio 1% solução de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) (GIBCO™). Para os ensaios as células foram plaqueadas a 1×10^5 células por poço, em placas de 96 poços e mantidas em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

3.5 Zika vírus

3.5.1 Identificação da amostra viral

A cepa ZIKV PE243/2015 (abreviatura de ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015) utilizada nos experimentos foi doado pela Dra. Marli Tenório, pesquisadora do LaViTE do Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ-PE.

3.5.2 Produção do estoque viral

Uma amostra do vírus foi inoculada em células Vero (ATCC® CCL81TM) e incubada em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 dias até que o efeito citopático fosse observado em quase todo o tapete celular. Após isto, a garrafa de cultura passou por um ciclo de congelamento e descongelamento e a suspensão foi transferida para um tubo tipo —falcon e então centrifugada a 400g/ 10 minutos sobre temperatura de refrigeração (4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante – o qual contém as partículas virais – foi aliquoteado em criotubos em um volume de 1,0 ml. A passagem do vírus utilizada para todos os experimentos foi a de número 4.

3.5.3 Titulação do estoque viral

O estoque do vírus foi titulado através de ensaio de placa. Para tal, células Vero (1×10^5 células/ poço) foram semeadas em placas de 24 poços e então infectadas com 7 diluições seriadas dos estoques de vírus Zika. Para cada diluição, 3 replicatas foram realizadas. Após 1 hora de adsorção em estufa a 37°C e 5% de CO₂, o inóculo foi retirado e então adicionado o meio contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC) em volume final de 2,0 ml por poço. Após 6 dias de infecção, as placas foram coradas com cristal violeta 3% e o número total de placas foi determinado por contagem a olho nu. Os valores foram expressos em unidades formadoras de placa (UFP/ml).

Cálculo do título viral:

$$\text{Título} = P \times F \times 10^X \text{ (PFU/mL)}$$

P= média do número de placas obtido na diluição em que se contou as placas.

F= Fator de correção para expressar o título de PFU/mL (1000µL / volume do inóculo).

10^X= Diluição em que as placas foram contadas.

3.6 Ensaio de citotoxicidade

As células Vero foram semeadas em placas de 96 poços (1,0 x 10⁵) e mantidas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 24h. Após esse período, o meio de cultura foi recolhido e foram adicionados os derivados em concentrações distintas (5, 10, 50, 100 e 200µM). Foram utilizados os seguintes controles: **1** - controle do branco, apenas meio de cultivo (meio + soro); **2** – controle celular (células + meio de cultivo); **3** - controle com o solvente dos compostos, Dimetilsulfóxido (DMSO) 2% (Sigma Aldrich) (células + meio de cultivo + DMSO); **4** – Cloroquina, como controle de droga. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 72h. Após esse período, foram adicionados 20µL da solução de MTT (Sigma Aldrich) (0,5mg/mL) em cada poço e as placas voltaram para estufa por mais 3 horas. Essa etapa do ensaio permite a redução do MTT por células metabolicamente ativas a cristais de formazan. Em seguida, foram adicionados 130µl da solução de dodecil sulfato de sódio – SDS (Sigma Aldrich) à 20% para dissolução do precipitado. Após 24 horas, a absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm (BioTek EL808). Foram realizados 3 experimentos independentes, todos em triplicata. O CC₅₀ (concentração do derivado que reduz em 50% o crescimento celular) de cada derivado foi definido a partir do seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Absorbância das células tratadas com os novos derivados} - \text{Absorbância das células não tratadas} \times 100}{\text{Absorbância do controle celular} - \text{Absorbância do controle veicular (DMSO)}}$$

3.7 Atividade antiviral

Para o ensaio antiviral, as células Vero foram semeadas em placas de 96 poços ($1,0 \times 10^5$) e permaneceram em estufa 37°C a 5% de CO_2 por 24h. Após esse período, o meio foi descartado e o ensaio foi montado da seguinte maneira: **1** - Controle do branco, apenas meio de cultivo (meio + soro); **2** - Controle celular (células + meio de cultivo); **3** - Controle viral (células + vírus). No restante da placa, foram realizados os ensaios antivirais para os 40 derivados TZDs e para a cloroquina com diferentes concentrações (5, 10, 50, 100 e $200\mu\text{M}$). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 72h. Após esse período, foram adicionados $20\mu\text{L}$ da solução de MTT (Sigma Aldrich) ($0,5\text{mg/mL}$) em cada poço e as placas voltaram para estufa por mais 3 horas. Em seguida, foram adicionados $130\mu\text{L}$ da solução de dodecil sulfato de sódio – SDS (Sigma Aldrich) à 20% para dissolução do precipitado. Após 24 horas, a absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm (BioTek EL808). Foram realizados 3 experimentos independentes, todos em triplicata. O IC_{50} (concentração do derivado capaz de inibir em 50% a replicação viral) de cada derivado foi definido a partir do seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Absorbância das células tratadas com os novos derivados} - \text{Absorbância das células não tratadas}}{\text{Absorbância do controle celular} - \text{Absorbância do controle veicular (DMSO)}} \times 100$$

3.8 Determinação do índice de Seletividade (IS)

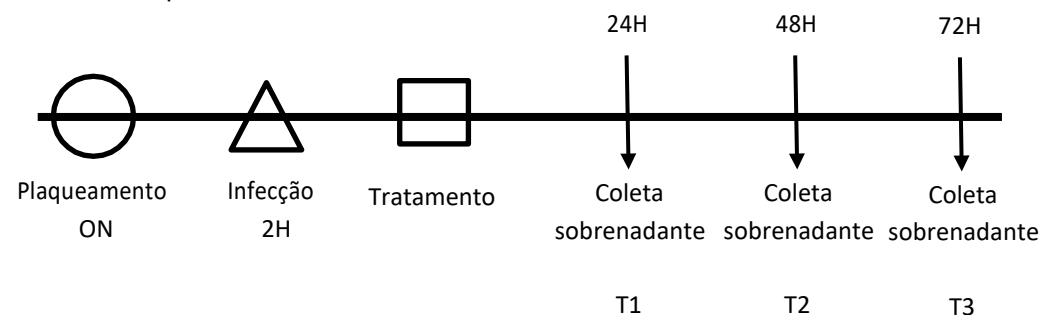
A partir dos valores encontrados de CC_{50} e IC_{50} , foi calculado o índice de seletividade ($\text{CC}_{50} / \text{IC}_{50} = \text{IS}$) que expressa a segurança da substância testada e, dessa forma, viabiliza a realização de outros ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Coen & Richman, 2007; Dezengrini *et al.*, 2009). Os valores de IS são considerados positivos a partir de 4, e quanto maior é esse valor, considera-se o derivado como mais promissor (Amoros *et al.*, 1992).

3.9 Tratamento com os Derivados TZDs Pós Infecção

Para avaliar se os derivados eram capazes de interferir nas etapas intracelulares da replicação viral, as células Vero foram semeadas em placas de 96 poços (1×10^5 cél/poço).

Após 24 horas de incubação em estufa para adesão do tapete celular, o sobrenadante foi recolhido e 50µl de meio de cultura contendo ZIKV (MOI=0,5) foi adicionada às células. As placas foram então colocadas em estufa durante 2h para adsorção viral. Passado este tempo, o inóculo foi retirado e foram adicionados 50µl de cada derivado de acordo com o CC₅₀ encontrado. Em seguida foram adicionados 150µl de meio de cultura, completando o volume final para 200µl e foram novamente incubadas em estufa por até 72h. Após os tempos de 24, 48 e 72h os sobrenadantes de cada respectivo tempo foram coletados e estocados a -80°C para posteriores ensaios (Figura 10).

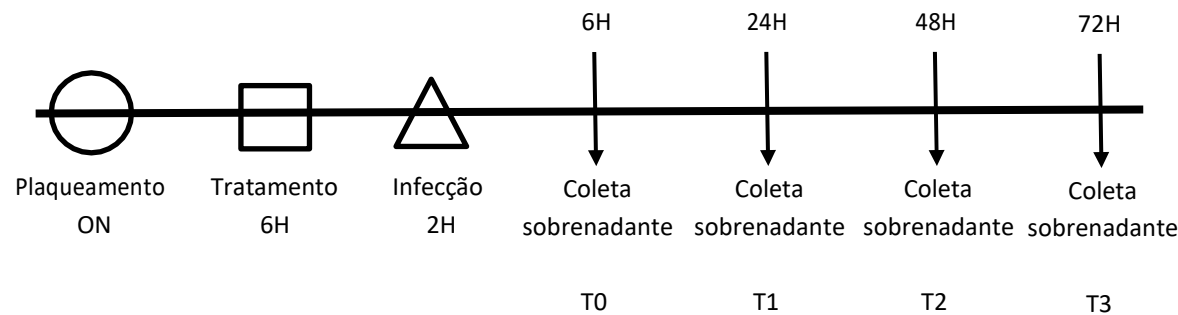
Figura 10 - Ensaio experimental para avaliação do possível efeito antiviral dos novos derivados pós infecção com o ZIKV. Fonte: Produzido pela autora.



3.10 Tratamento com os Derivados TZDs Pré Infecção

Para avaliar se os novos derivados teriam a capacidade de proteger as células Vero contra à infecção pelo ZIKV, gerando dessa forma um estado antiviral nas mesmas, estas foram semeadas em placas de 96 poços (1x10⁵ cél/poço). Após 24 horas de incubação em estufa para adesão do tapete celular, o sobrenadante foi recolhido e as células foram tratadas com os novos derivados (50µl de cada concentração correspondente) durante 6h. Após esse período, as células foram infectadas com ZIKV (MOI=0,5) e então colocadas em estufa por 2h para adsorção viral. Passado este tempo, o inóculo foi retirado e foram adicionados 200µl de meio de cultura, as placas foram novamente incubadas em estufa por até 72h. Após os tempos de 6, 24, 48 e 72h os sobrenadantes de cada respectivo tempo foram coletados e estocados a -80°C para posteriores ensaios (Figura 11).

Figura 11: Ensaio experimental para avaliação do possível efeito protetor dos novos derivados às células VERO infectadas com o ZIKV. Fonte: Produzido pela autora.



3.11 Extração de RNA

O RNA viral dos sobrenadantes das culturas celulares descritas nos itens 3.9 e 3.10 foi extraído utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Após extração, os RNAs foram estocados a -80°C até realização da RT-qPCR.

3.12 Redução do número de cópias virais por RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizada para quantificação do RNA viral presente nos sobrenadantes de cultura obtidos nos ensaios descritos nos tópicos 3.9 e 3.10 empregando-se primers previamente descritos por Lanciotti et al., 2008, e de acordo com protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Virologia do Departamento de Virologia e Terapia Experimental da Fiocruz/PE. Para as reações de RT-qPCR foi utilizado o Kit QIAGEN One Step RT-qPCR (QIAGEN, Alemanha). Esse kit realiza a confecção do cDNA seguida da PCR em um único passo, minimizando etapas experimentais. Para realização da técnica foram seguidas as orientações do fabricante.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada para avaliar as diferenças na redução do número de cópias virais em células infectadas tratadas com os compostos químicos, em diferentes concentrações e intervalos de tempo de administração. A análise comparou as células tratadas com as não tratadas. Os dados foram quantificados por meio do teste ANOVA de duas vias. O valor de $p < 0,05$

foi considerado estatisticamente significativo. Os dados refletem: * $p < 0,05$ para a concentração mais alta do derivado testado. @ $p < 0,05$ para a menor concentração do derivado testado. Com os resultados obtidos pelo ensaio de citotoxicidade e antiviral, foi realizada uma regressão linear que gerou um valor de CC_{50} e IC_{50} de cada derivado. Todas as análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism® versão 6. Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes.

O programa GOLD 5.7 foi aplicado para os cálculos de docking para avaliar os graus de liberdade do receptor usando-se a função de score ChemPLP. O programa BINANA foi utilizado para analisar as interações moleculares nos complexos obtidos nos resultados de docking. As figuras foram geradas utilizando-se o programa Pymol.

3.14 Aspectos éticos

O presente trabalho não tem qualquer implicação ética, uma vez que todos os ensaios foram realizados em células imortalizadas.

4 RESULTADOS

4.1 CC₅₀, IC₅₀ e IS

Foram calculados os valores referentes ao CC₅₀ (concentração do derivado capaz de reduzir em 50% o crescimento celular), IC₅₀ (concentração do derivado capaz de inibir em 50% a replicação viral) e os valores resultantes da razão entre eles, que corresponde ao IS (índice de seletividade), que determina o quanto o composto é ativo sem causar danos à viabilidade celular. Os valores encontrados estão listados na tabela 1e 2.

Tabela 1. Valores de CC₅₀, IC₅₀ e IS dos derivados promissores. CC₅₀: Concentração citotóxica dos derivados para causar a morte correspondente a 50% das células viáveis. IC₅₀: Concentração correspondente a 50% de inibição do crescimento do ZIKV. IS: Índice de seletividade CC₅₀ / IC₅₀. Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes.

Derivados	CC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IS
GQ-394	181,10 ± 0,018	1,95 ± 0,5	92,87
GQ-396	79,26 ± 0,07	3,24 ± 0,03	24,46
GQ-402	132,38 ± 0,06	3,73 ± 0,72	35,38
ZKC-2	102,68 ± 14,16	0,94 ± 5,93	109,23
ZKC-3	107,22 ± 7,24	3,75 ± 2,86	28,59
ZKC-4	63,69 ± 10,67	1,27 ± 5,13	50,14
ZKC-8	100 ± 7,38	0,27 ± 14,23	370,37
ZKC-9	100 ± 0,54	5,10 ± 0,80	19,60
JB-3	79 ± 13,05	3,73 ± 0,65	21,17
FT-32	100 ± 0,94	4,21 ± 0,22	23,75
FT-39	100 ± 0,24	0,28 ± 0,06	357,14
Cloroquina	170,50 ± 0,8	5,6	30,44

Dos 40 derivados TZDs testados, apenas 11 deles apresentaram índice de seletividade próximo ou superior a 20, assim como a cloroquina (IS=30,44). Alguns derivados apresentaram um valor de IS consideravelmente alto, como o ZKC-2 (IS=109,23), ZKC-8 (IS=370,37) e FT-9 (SI=357,14). Estes derivados promissores foram selecionados para os próximos ensaios.

Os demais derivados, não apresentaram proteção celular e nem afinidade para o vírus, apresentando IS <10. Sendo assim, não foram utilizados nas análises posteriores. Estes dados estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Valores de CC₅₀, IC₅₀ e IS dos demais derivados. CC₅₀: Concentração citotóxica dos derivados para causar a morte correspondente a 50% das células viáveis. IC₅₀: Concentração correspondente a 50% de inibição do crescimento do ZIKV. IS: Índice de seletividade CC₅₀ / IC₅₀. Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes.

Derivados	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IS
GQ393	170,98 ± 0,54	>100	<2,00
GQ103	12,05 ± 0,94	>100	<2,00
GQ106	153,04 ± 0,24	18,56 ± 0,22	8,24
GQ138	37,60 ± 0,06	>100	<2,00
GQ140	111,92 ± 0,018	>100	<2,00
GQ400	168,32 ± 0,07	>100	<2,00
GQ403	47,95 ± 1,2	>100	<2,00
ZKCE-1	>200	>100	2
ZKC-1	>200	27,53 ± 7,38	7,26
ZKC-5	>200	>100	2
ZKC-6	>200	>100	2
ZKC-10	>200	>100	2
JB-10	>200	>100	2
JB-16	>200	>100	2
JB-17	>200	46,22 ± 4,71	4,32
JB-18	>200	>100	2
JB-19	>200	>100	2
JB-23	>200	>100	2
JB-24	>200	>100	2
FT-16	>200	>100	2
FT-19	>200	>100	2
FT-31	>200	>100	2
FT-34	>200	>100	2
FT-35	>200	>100	2
FT-36	>200	>100	2
FT-38	>200	>100	2
FT-40	>200	>100	2

4.2 Redução do número de Cópias de RNA viral

Após selecionar os derivados mais promissores de acordo com o IS e determinar as concentrações dos mesmos a partir do CC₅₀, os derivados foram avaliados quanto ao seu efeito na expressão do RNA viral.

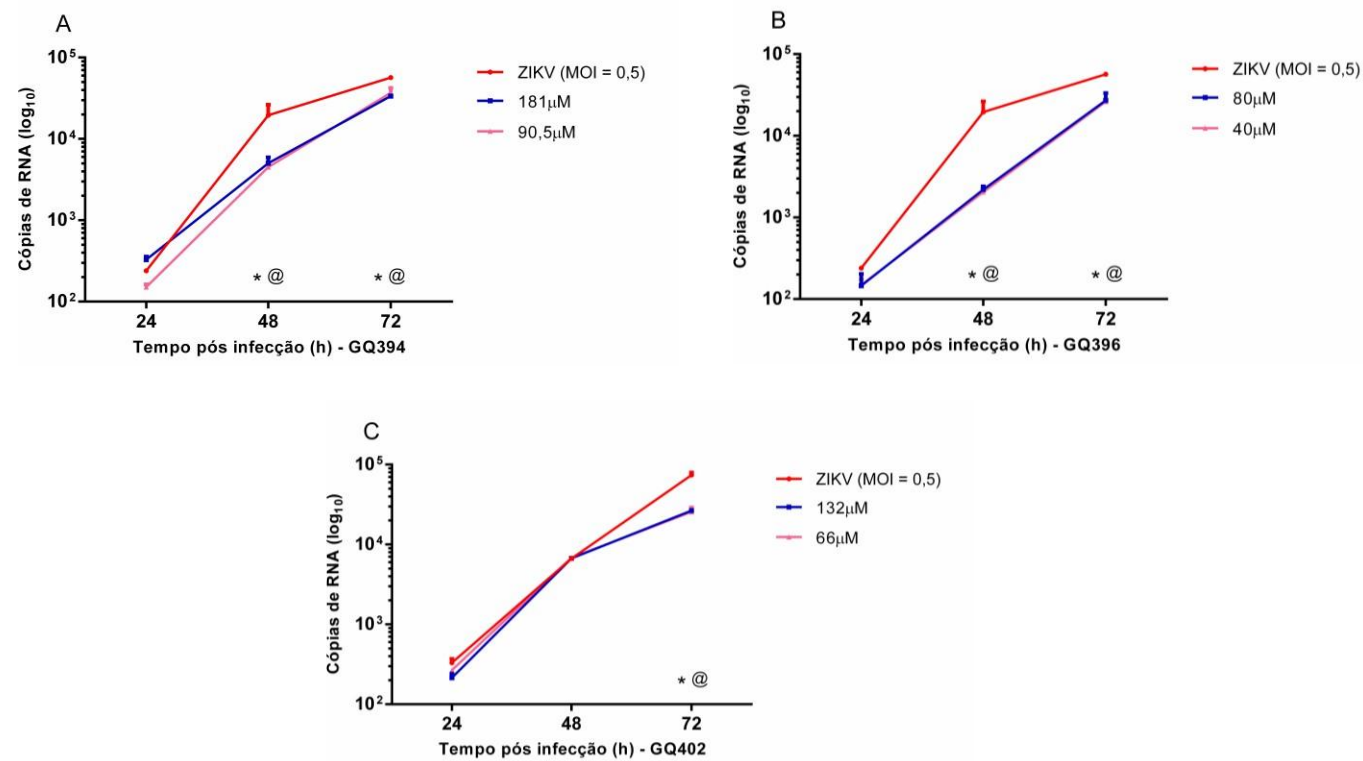
4.2.1 Tratamento pós infecção

As células foram infectadas e tratadas com os derivados por 24, 48 e 72h, em seguida foram avaliadas quanto a ação dos derivados na redução da expressão de RNA do vírus nos seus respectivos tempos e nas concentrações selecionadas.

Conforme mostrado nas figuras abaixo, observamos que os derivados conseguiram reduzir o número de cópias virais nas duas concentrações testadas desde os estágios mais iniciais pós infecção (24h). Para todos os derivados obtivemos um valor de $p < 0,05$.

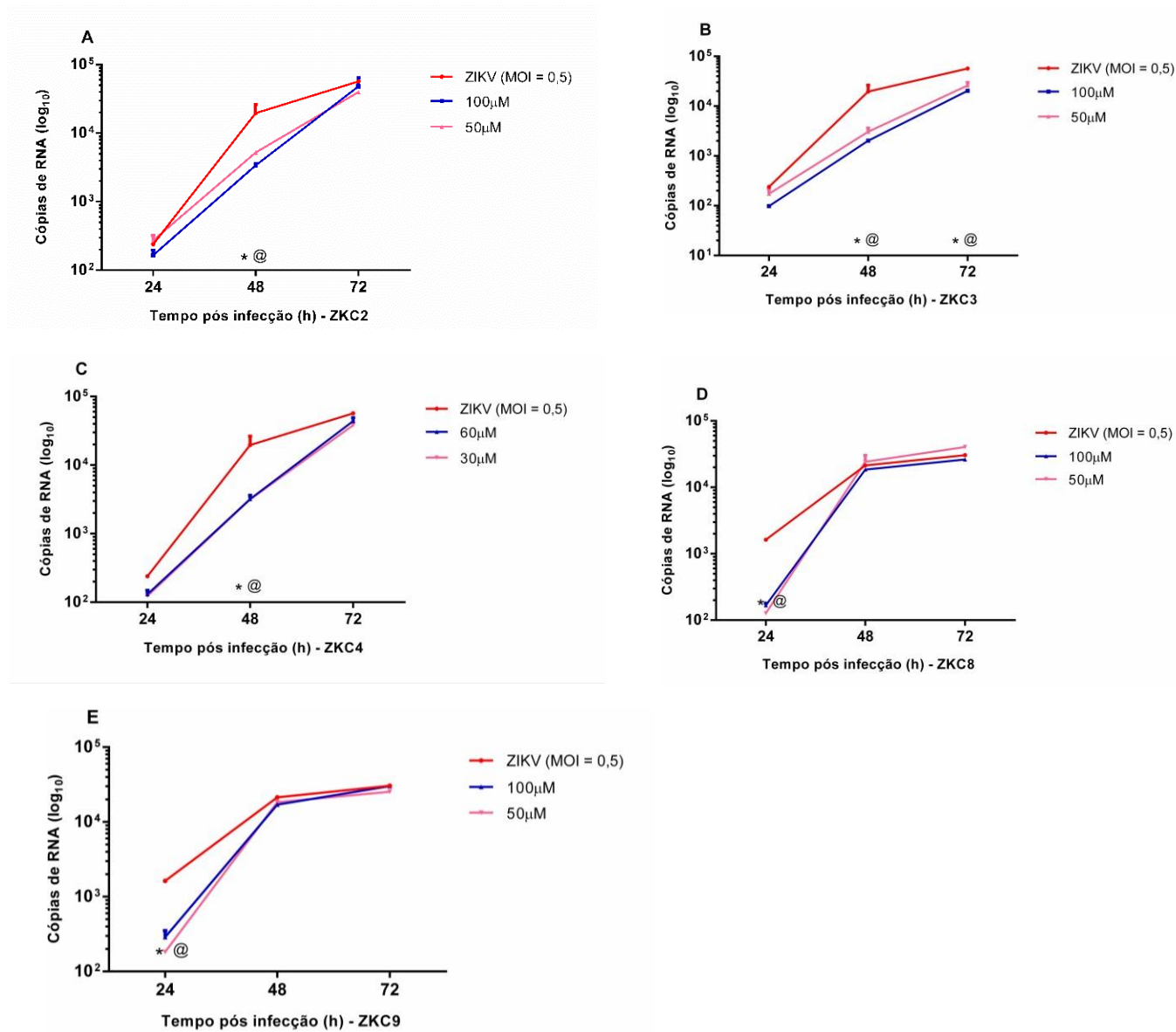
Podemos observar de acordo com a figura 12 que utilizando a concentração mais baixa dos derivados (1/2 CC₅₀) da série GQ (GQ394, GQ396 e GQ402) obtivemos uma resposta semelhante à maior concentração usada. Tanto o derivado GQ394 e 396 foram capazes de reduzir o número de cópias de RNA viral nos tempos de 48 e 72 horas pós infecção (hpi). Já o GQ402 mostrou atividade mais tardia, tendo ação apenas no tempo de 72hpi.

Figura 12 - Expressão do RNA viral na presença dos derivados GQs pós infecção. Os dados refletem a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando $< 0,05$; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: (A) Tratamento com derivado GQ934. (B) Tratamento com derivado GQ396. (C) Tratamento com o derivado GQ402. MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



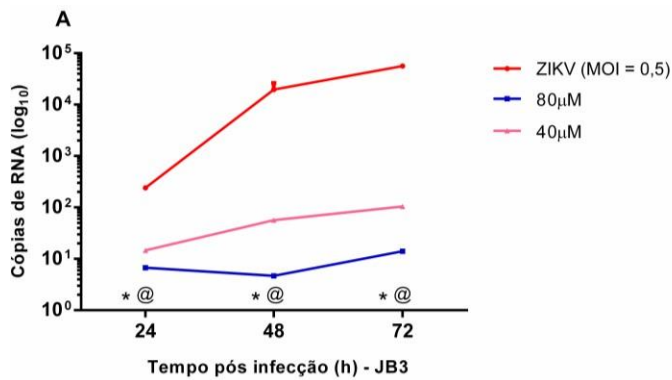
Da mesma maneira que os derivados da série GQ, os derivados ZKCs também tiveram uma ação semelhantes entre as duas concentrações utilizadas. ZKC 2, 3 e 4 influenciam na replicação viral a partir de 48hpi., entretanto, ZKC 2 e 4 não tem ação no tempo de 72hpi. Já os ZKC 8 e 9 possuem ação apenas nos estágios mais iniciais da infecção 24hpi (Figura 13).

Figura 13 - Expressão do RNA viral na presença dos derivados ZKCs pós infecção. Os dados refletem a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando $<0,05$; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: (A) Tratamento com derivado ZKC2. (B) Tratamento com derivado ZKC3. (C) Tratamento com o derivado ZKC4. (D) Tratamento com o derivado ZKC8. (E) Tratamento com o derivado ZKC9. MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



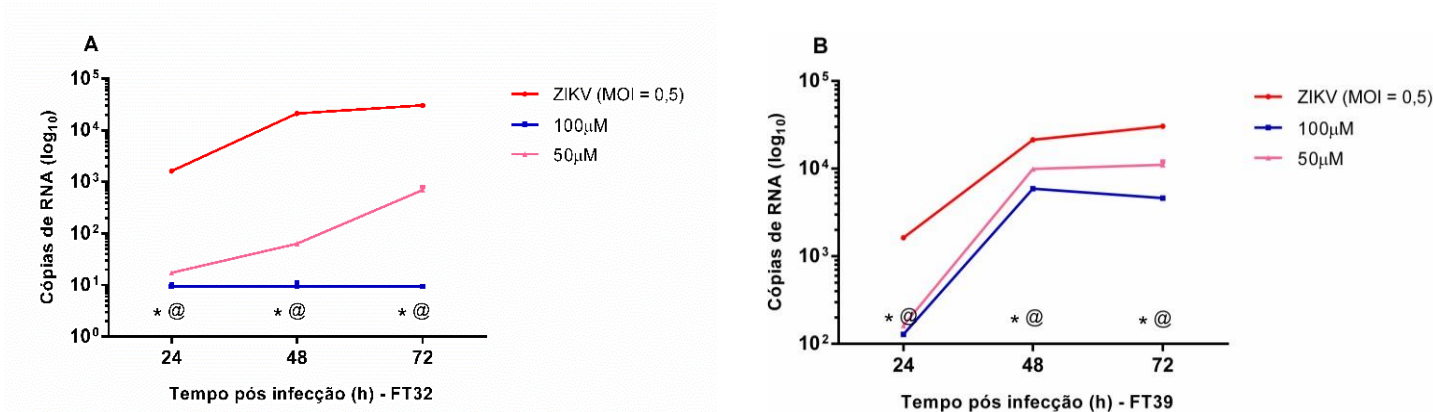
O derivado JB3 nos chama atenção pela acentuada redução do número de cópias virais desde de 24hpi e manutenção desses baixos níveis nos tempos de 48 e 72hpi, mesmo na sua menor concentração utilizada (40µM) (Figura 14).

Figura 14 - Expressão do RNA do ZIKV na presença do derivado JB3 após infecção. Os dados refletem a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando $<0,05$; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



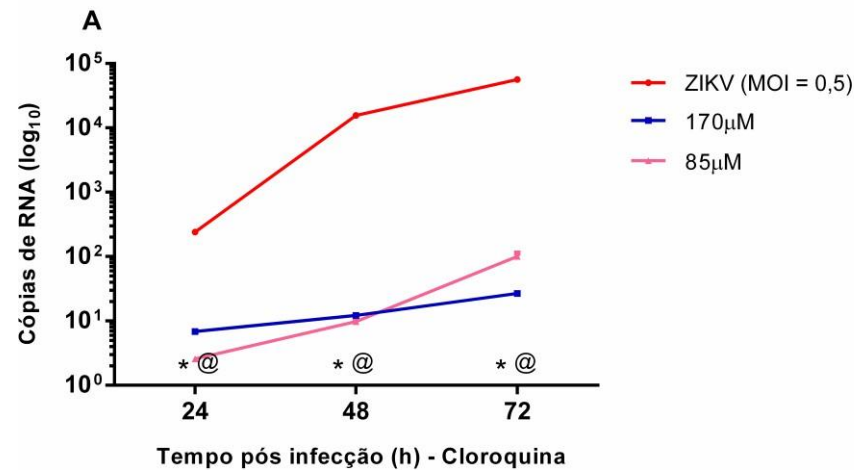
FT32 apresenta uma ação bastante semelhante ao derivado JB3, tanto com relação a concentração utilizada, como na capacidade de manter os níveis de RNA viral bastante reduzidos desde 24hpi (figura 15A). Já o derivado FT39, promove uma acentuada redução viral com 24hpi. No tempo de 48hpi, essa carga viral volta a subir e com 72hpi tem uma pequena redução (figura 15B).

Figura 15 - Expressão do RNA do ZIKV na presença dos derivados FTs após infecção. Os dados refletem a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando $<0,05$; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: (A) Tratamento com derivado FT32. (B) Tratamento com o derivado FT39. MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



A cloroquina foi utilizada como controle padrão de droga. De acordo com a figura 16, podemos observar que ela mantém a redução do RNA viral nos tempos de 24, 48 e 72hpi.

Figura 16 - Expressão do RNA do ZIKV na presença da cloroquina após infecção. Os dados refletem a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando $<0,05$; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



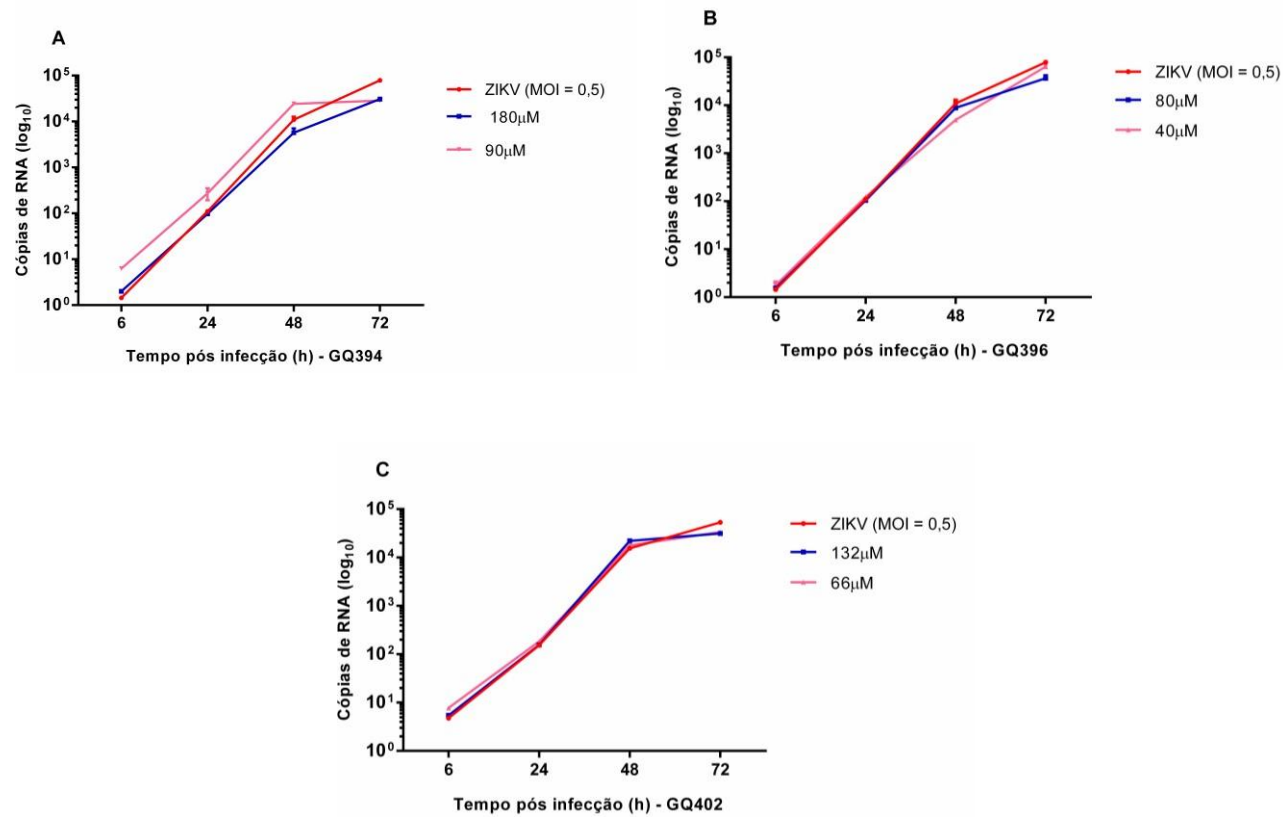
4.2.2 Tratamento pré infecção

Como os derivados avaliados foram capazes de reduzir a carga viral pós infecção com o ZIKV de forma significativa, optamos por avaliar se estas mesmas drogas poderiam apresentar efeito protetor nas células contra a infecção por ZIKV.

Após semeadas, as células receberam tratamento com os derivados durante 6h. Após esse período, o ZIKV foi inoculado e as células permaneceram em cultura por até 72h. A cada 24h o sobrenadante era coletado e armazenado.

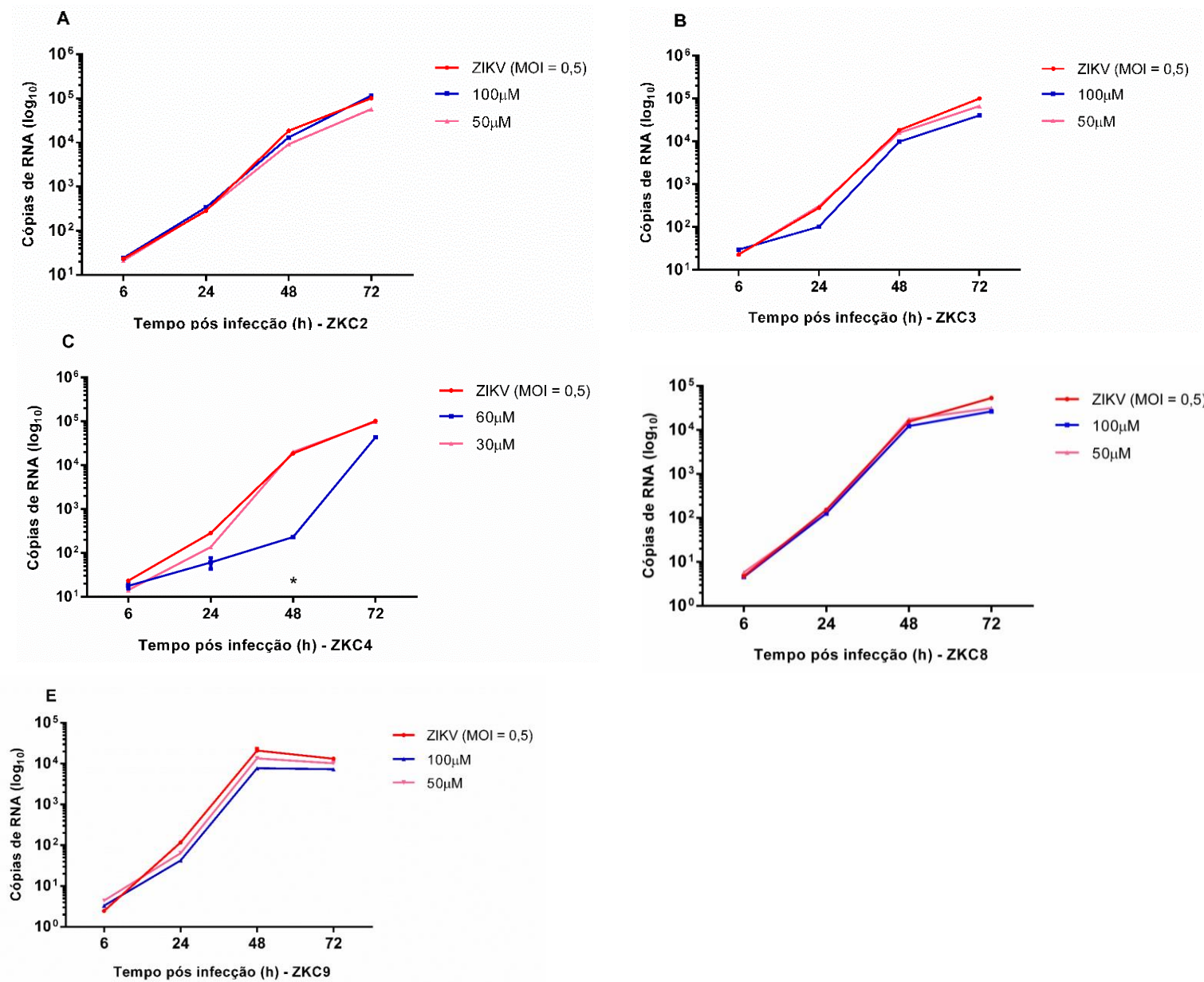
Na figura 17, observamos que nenhum dos 3 derivados da série GQ foram capazes de reduzir o número de cópias de RNA viral, quando as células receberam o tratamento prévio.

Figura 17 - Expressão do RNA viral quando as células foram previamente tratadas com os derivados GQ. Os dados refletem a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando $<0,05$; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: (A) Tratamento com derivado GQ934. (B) Tratamento com derivado GQ396. (C) Tratamento com o derivado GQ402 MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



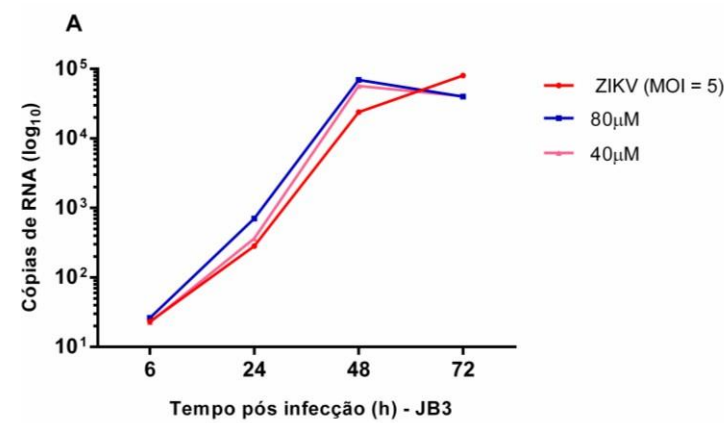
Os derivados ZKC2, -3, -8 e -9 não apresentaram ação protetora para as células previamente tratadas (Figura 18 A, B e D). Entretanto, percebemos que quando as células receberam tratamento prévio com o derivado ZKC4 na concentração de 60 μM, ocorre uma redução na expressão de RNA viral de maneira significativa nos tempos de 24 e 48hpi.

Figura 18 - Expressão do RNA do ZIKV quando as células foram previamente tratadas com os derivados ZKCs. Os dados refletem a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando $<0,05$; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: (A) Tratamento com derivado ZKC2. (B) Tratamento com derivado ZKC3. (C) Tratamento com o derivado ZKC4. (D) Tratamento com o derivado ZKC8. (E) Tratamento com o derivado ZKC9. MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



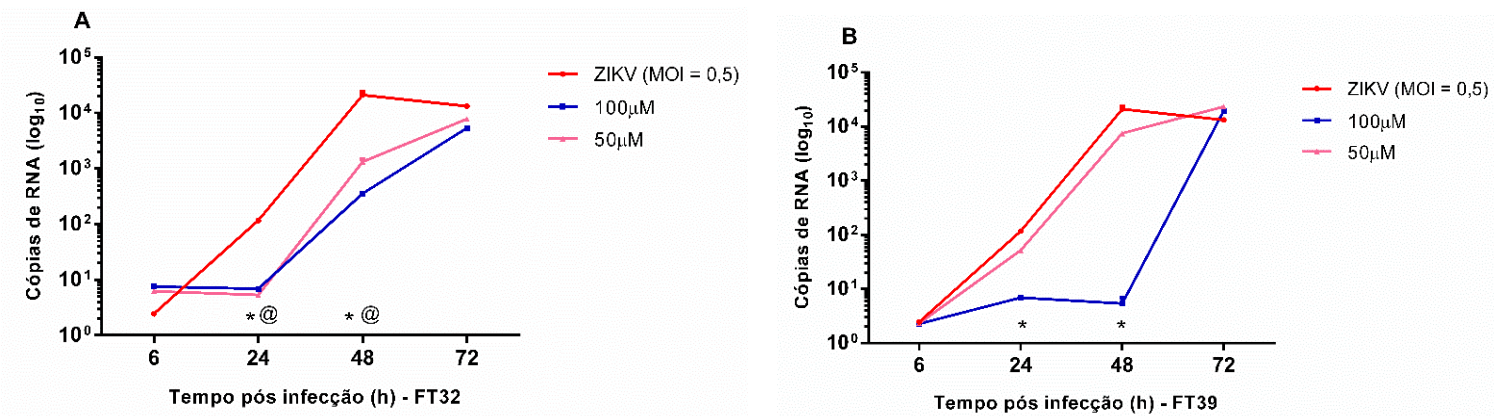
Apesar do excelente desempenho do derivado JB3 em reduzir a expressão de RNA viral após a infecção celular, o mesmo não pode ser visto quando as células receberam tratamento prévio. Nem em sua maior concentração o derivado foi capaz de reduzir o número de cópias de RNA viral nos tempos analisados (Figura 19).

Figura 19 - Expressão do RNA do ZIKV quando as células foram previamente tratadas com o derivado JB3. Os dados refletem a média ± DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando <0,05; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



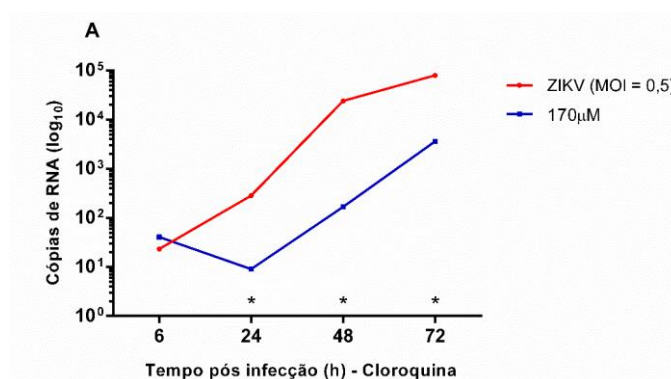
Chamando nossa atenção para seu efeito pós infecção, os derivados FTs também apresentaram um bom desempenho quando desafiados a protegerem as células da infecção pelo ZIKV. FT32 foi capaz de reduzir a expressão de RNA viral em ambas as concentrações avaliadas nos estágios mais iniciais (24 e 48hpi) (Figura 20A). Já o FT39 reduziu significativamente a expressão do vírus em sua maior contração testada (100µM), também nos estágios iniciais da infecção (24 e 48hpi) (Figura 20B).

Figura 20 - Expressão do RNA viral ZIKV quando as células foram previamente tratadas com os derivados FTs. Os dados refletem a média ± DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando <0,05; * representa a significância para a concentração mais alta e @ para a menor concentração testada, em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: (A) Tratamento com derivado FT32. (B) Tratamento com o derivado FT39. MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



Com relação a cloroquina, observamos na figura 21 que ela conseguiu manter a redução da expressão de RNA nas células previamente tratadas em sua maior concentração de 170 μ M, nos tempos de 24, 48 e 72hpi.

Figura 21 - Expressão do RNA do ZIKV quando as células foram previamente tratadas com a cloroquina. Os dados refletem a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. P foi considerado estatisticamente significativo quando $<0,05$ em comparação com ZIKV (MOI=5). Legenda: MOI - Multiplicidade de infecção. Hpi – horas pós infecção. ZIKV (MOI = 0,5) – Célula + meio de cultivo + ZIKV.



No nosso estudo, mostramos que quando a cloroquina é inserida nas células após a infecção com o ZIKV, ela mantém a redução do número de cópias do RNA viral desde o tempo de 24hpi. Quando o tratamento foi realizado antes da infecção, observamos uma redução acentuada no tempo de 24hpi seguida de uma elevação da expressão do RNA nos tempos de 48 e 72hpi. Em ambos os estágios de tratamento, a cloroquina mostra a capacidade de reduzir de forma significativa a carga viral tanto antes quanto depois das células serem infectadas pelo ZIKV.

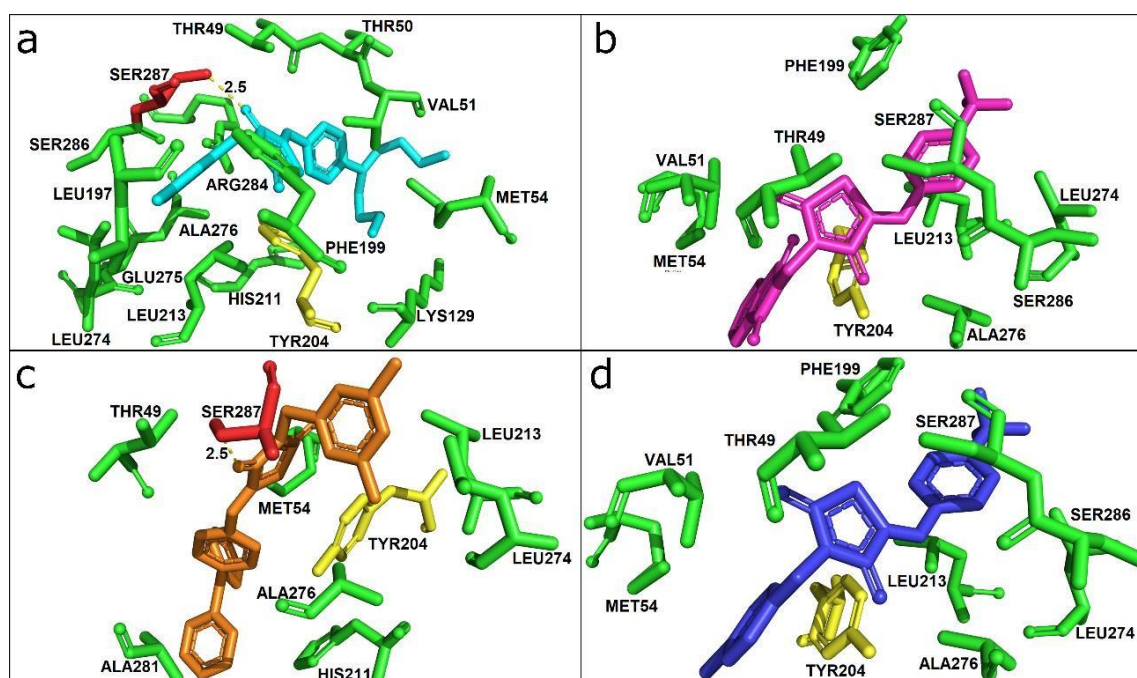
4.3 Docking Molecular

Em paralelo aos ensaios *in vitro*, a análise *in silico* dos 40 derivados foram realizadas sobre a proteína do envelope e na proteína não estrutural NS5.

4.3.1 Ligação dos derivados à proteína E

Entre os onze compostos que mais se destacaram neste sítio ativo, cinco deles FT (16, 34, 35, 36 e 38), quatro JB (10, 16, 17 e 18), dois ZKC (9 e 4) e um possui GQ (403).

Figura 22 - Interações intermoleculares entre os resíduos do sítio da proteína E e os derivados (a) JB-17 (ciano), (b) FT-35 (magenta), (c) JB-16 (laranja) e (d) ZKC-09 (azul). Os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão em vermelho, pi-pi stacking em amarelo e contatos hidrofóbicos em verde.

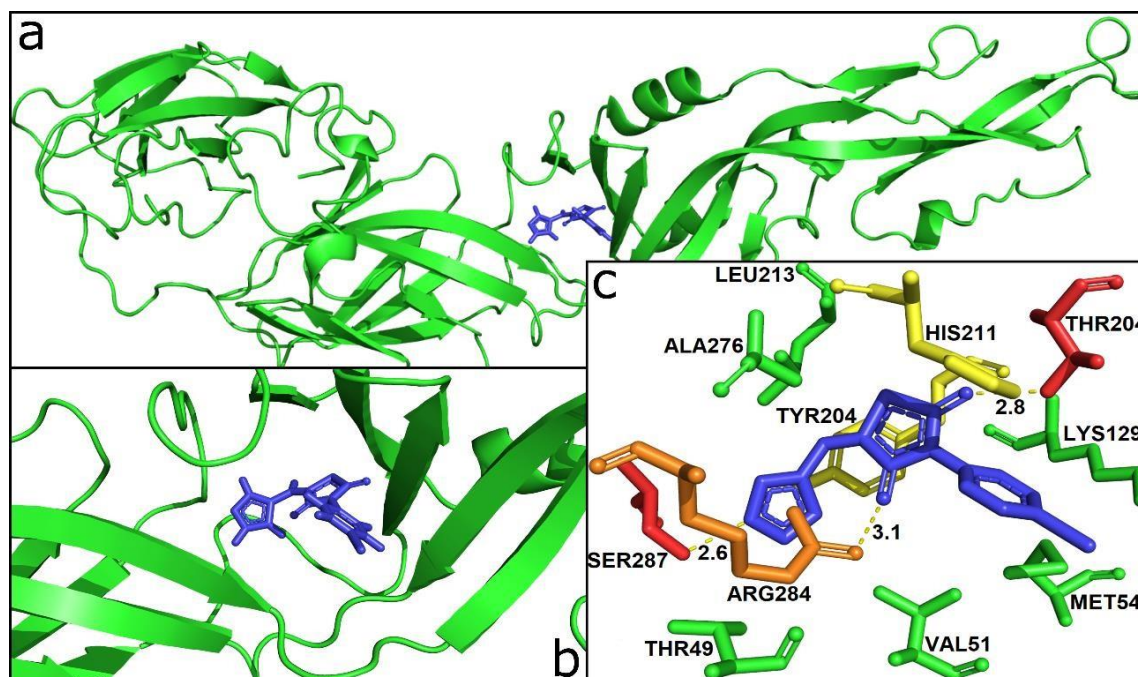


Os derivados JB-17 (Figura 22a) e JB-16 (Figura 22c), primeiro e terceiro melhores compostos em termos de afinidade predita no sítio ativo da proteína E. Além disto, observou-se que o composto ZKC-09 (Figura 22d), quarto melhor composto em termos de afinidade predita, foi o único composto da série ZKC a se destacar neste sítio. Os derivados FTs realizaram interações do tipo pi-pi stacking (FT-34 e FT-36), ligações de hidrogênio com pelo menos um dos oxigênios (FT-19 e FT-31) e ambos os tipos de interação, ligação de hidrogênio e pi-pi stacking simultaneamente no fragmento 2,4-diona de um mesmo composto (FT-32).

O derivado ZKC-4 (Figura 23) realizou três ligações de hidrogênio, com distâncias (doador-aceitador) de 2.6 Å (SER287), 2.8 (THR204) e 3.1 (ARG284), duas interações do tipo pi-pi stackings, uma interação do tipo cátion-pi e contatos hidrofóbicos com os resíduos.

Observando as interações intermoleculares, pode-se notar duas características interessantes: i) As três ligações de hidrogênio que se formaram estão bem distribuídas ao longo do composto e ii) Cada anel aromático que compõe o ZKC-4 formou uma interação do tipo pi (Figura 23c). Um elevado número de interações intermoleculares que ocorrem entre o ZKC-4 e a proteína E pode indicar que este composto tem o potencial de apresentar estabilidade no sítio ativo desta proteína.

Figura 23 – Interações intermoleculares entre o derivado ZKC-4 (azul) e a proteína de envelope (verde). (a) Imagem completa da proteína E e o ZKC-4. (b) Imagem em zoom da região do sítio ativo. (c) Os resíduos do sítio ativo que interagem com o ZKC-4, formando ligações de hidrogênio (vermelho), pi-pi stacking (amarelo), cátion-pi (laranja) e contatos hidrofóbicos (verde).



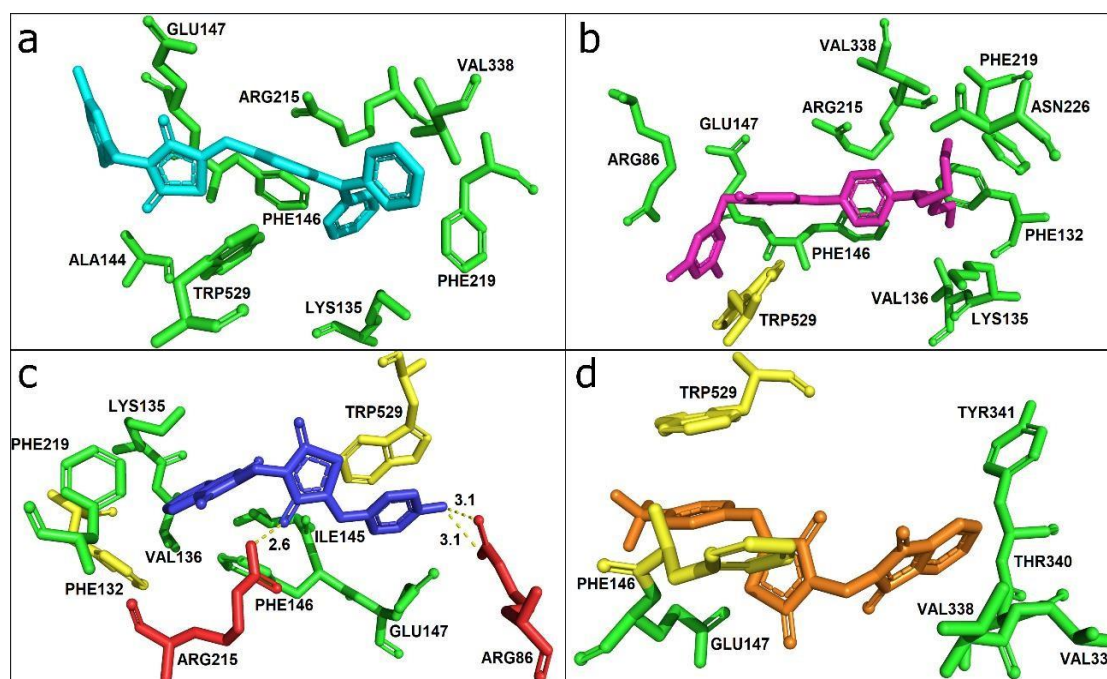
4.3.2 Ligação dos derivados à proteína NS5

Identificou-se três regiões de sítio ativo para a proteína não estrutural 5 (NS5) do vírus da Zika (ZIKV), são eles: i) RdRp; ii) MTase 2'-O e iii) MTase N-7. Os cálculos de docking molecular foram realizados em todos os três sítios de ligação.

4.3.2.1 RdRp

Entre os oito compostos que mais se destacaram neste sítio ativo, cinco deles do tipo FT (16, 19, 35, 36 e 40) e três deles do tipo JB (13, 16 e 17). Dos compostos FT, sete deles realizaram interações do tipo pi-pi stacking, sendo que cinco destes adicionalmente realizaram ligações de hidrogênio utilizando-se dos oxigênios presentes na estrutura 2,4-diona do chassi dos compostos FT.

Figura 24 - Interações intermoleculares entre os resíduos do sítio ativo da NS5-RdRp e os compostos (a) JB-16 (ciano), (b) JB-17 (magenta), (c) FT-40 (azul) e (d) FT-35 (laranja). Os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão em vermelho, pi-pi stacking em amarelo e contatos hidrofóbicos em verde.

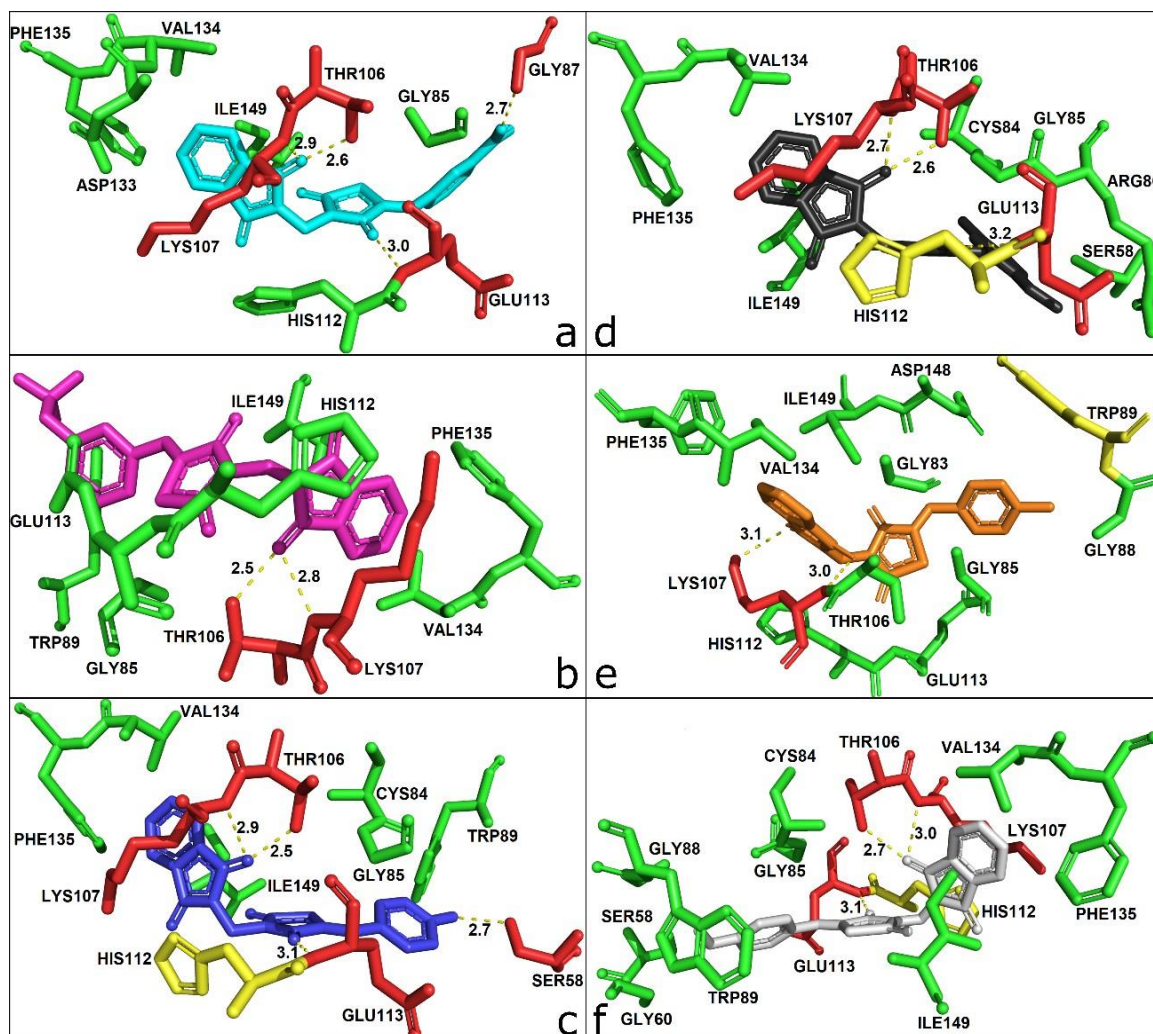


4.3.2.2 MTase 2'-O

Entre os dez compostos que mais se destacaram neste sítio ativo, oito deles do tipo FT (16, 19, 34, 35, 36, 38, 39 e 40) e dois deles do tipo JB (16 e 17).

Nota-se que entre os dez compostos que apresentaram uma melhor afinidade predita (ChemPLP), oito deles do tipo FT. Ao observar as interações intermoleculares, observa-se que estes oito compostos do tipo FT possuem uma característica em comum: todos eles realizaram duas ligações de hidrogênio utilizando pelo menos um dos oxigênios do grupo 2,4-diona, disponíveis apenas neste chassi molecular (FT).

Figura 25 – Interações intermoleculares entre os resíduos do sítio ativo NS5-MTase O'-2 e os compostos (a) FT-38 (ciano), (b) FT-19 (magenta), (c) FT-40 (azul), (d) FT-39 (preto), (e) FT-36 (laranja) e (f) FT-16 (branco). Os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão em vermelho, pi-pi stacking em amarelo e contatos hidrofóbicos em verde.



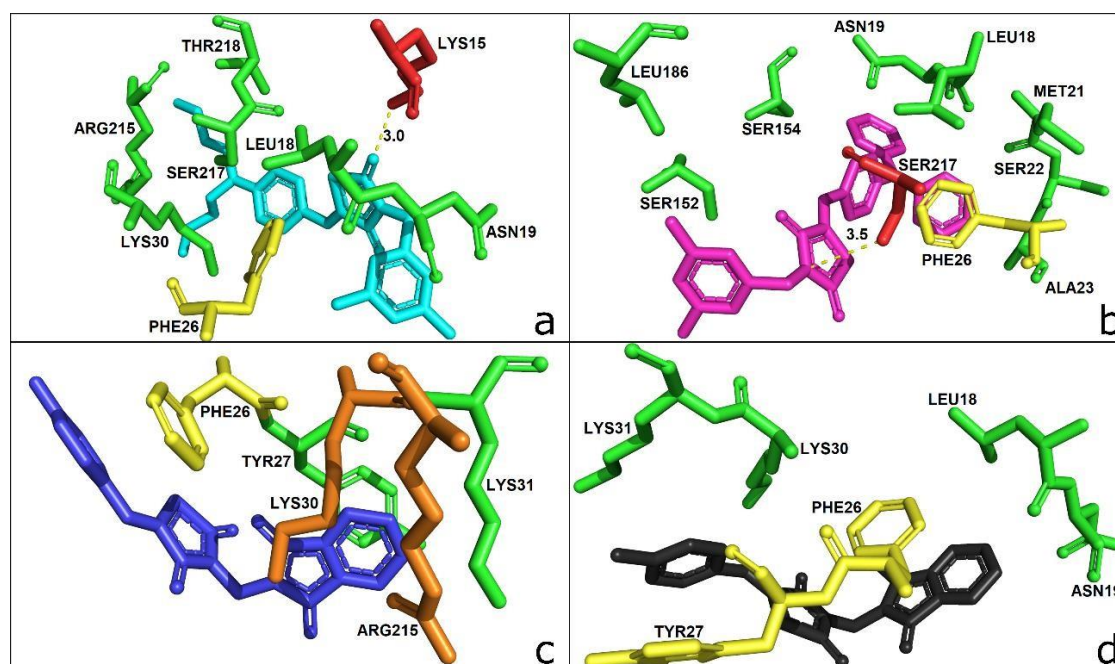
4.3.2.3 MTase N-7

Os nove compostos que mais se destacaram neste sítio ativo foram os FT (16, 19, 32, 35, 36 e 40) e os JB (10, 16 e 17).

É importante notar que boa parte dos contatos hidrofóbicos realizados por estes dois compostos JB-17 (Figura 25a) e JB-16 (Figura 25b) ocorreram com a parte dos substituintes butil e fenil destes compostos. O composto FT-40 (Figura 25c) realizou duas interações do tipo cátion-pi, uma interação do tipo pi-pi stacking e contatos hidrofóbicos com os resíduos. Enquanto isso, o composto FT-36 (Figura 25d) realizou duas interações do tipo pi-pi stacking e contatos

hidrofóbicos com os resíduos. Embora estes compostos tenham realizados menos contatos hidrofóbicos quando comparados com os compostos JB-17 e JB-16, os compostos FT-40 e FT-36 realizaram outros tipos de interação como as duas interações cátion-pi (FT-40) e um pi-pi stacking a mais (FT-36), ajudando a estabilizar estes compostos neste sítio ativo.

Figura 26 – Interações intermoleculares entre os resíduos do sítio ativo NS5-MTase N-7 e os compostos (a) JB-17 (ciano), (b) JB-16 (magenta), (c) FT-40 (azul) e (d) FT-36 (preto). Os resíduos que realizam ligações de hidrogênio estão em vermelho, pi-pi stacking em amarelo, cátion-pi em laranja e contatos hidrofóbicos em verde.



5. DISCUSSÃO

Como ainda não temos uma terapia específica para o tratamento da infecção causada pelo ZIKV, a proposta do presente estudo foi avaliar se derivados tiazolidínicos possuíam atividade contra o vírus ZIKA. Poucos são os estudos que avaliaram tiazolidínicos como potenciais antivirais. A maioria dos estudos encontrados avaliaram a Rosiglitazona para inibição do HIV, como este vírus pertence a outra classe que não Flavivírus, os achados não se estendem para os nossos resultados. Entretanto, nos mostra que os TZDs são uma classe de agentes com múltiplas atividades, desde a atividade hipoglicemiante a possíveis mecanismos antivirais (WAKUI et al., 2010; NITSCHKE et al., 2013; HUANG et al., 2015; MANVAR et al., 2015).

Através da modelagem molecular sobre a proteína NS5, nota-se que dos derivados que apresentaram uma melhor afinidade predita (ChemPLP), oito deles eram do tipo FT. Ao observar as interações intermoleculares, vemos que estes oito compostos do tipo FT possuem uma característica em comum: todos eles realizaram duas ligações de hidrogênio utilizando pelo menos um dos oxigênios do grupo 2,4-diona, disponíveis apenas neste grupo molecular (FT). Acredita-se que estas ligações de hidrogênio possam ter desempenhado um papel importante para a estabilidade dos compostos neste sítio ativo, quando comparados com os compostos que não possuem 2,4-diona em seus grupamentos moleculares.

Compilando os dados obtidos *in vitro* e *in silico*, podemos atribuir a redução da carga viral do FT32 e FT39 devido a sua afinidade de ligação à proteína NS5. Levando à inibição do processo de replicação, caracterizando um possível mecanismo de ação. Como já foi mencionado anteriormente, essa proteína possui papel crucial na replicação viral, bem como na supressão da resposta imune de interferon.

Jadav e colaboradores em 2015, sintetizaram uma série de 20 derivados arilalquilideno de 1,3-tiazolidin-4-ona e os avaliaram contra o vírus chikungunya (ChikV). Destes 20, 5 foram capazes de reduzir a replicação viral em doses < que 40µM. Posteriormente foi realizado o ensaio de ancoragem molecular, afim de avaliar qual o mecanismo de ação dos derivados ativos. Através desse ensaio foi descoberto que os compostos ativos inibiam a protease ChikV nsp2, interferindo no seu processo replicativo. Nitsche et al., 2013 e Manvar et al., 2015, avaliaram a capacidade de redução da carga viral de híbridos tiazolidínicos contra o vírus da dengue tipo 2 (DENV2). Avaliando o mecanismo de ação através da modelagem molecular, foi descoberto que os compostos tinham a capacidade de ligação e inibição da proteína NS5 do DENV2.

Num segundo momento investigamos se os derivados teriam a capacidade de bloquear a entrada do vírus na célula. Dessa maneira, as células receberam um tratamento prévio dos derivados, seguida da infecção. Os derivados JB-17 e JB-16, primeiro e terceiro melhores compostos em termos de afinidade predita no sítio ativo da proteína E, são os dois compostos da série JB com grandes grupos apolares como substituintes, dois fenis (JB-16) e dois butis (JB-17), o que pode ter ajudado estes dois compostos a realizarem um número maior de contatos hidrofóbicos. Entretanto, apenas os derivados GQ402 e ZKC4 foram capazes de se ligar a proteína do envelope e reduzir a carga viral.

Em 2019, Ho e colaboradores viram que a Palmatina reduzia a carga viral do ZIKV. Através de técnicas *in silico*, como o docking molecular foi observado que essa droga tinha a capacidade se ligar à proteína E e inibir a entrada do vírus na célula. Carneiro et al em 2016, avaliou o ECCG para a redução da carga viral do ZIKV. Em 2017, Sharma concluiu que essa redução da expressão de RNA viral se dava devido ao bloqueio da mudança conformacional da proteína do envelope durante o processo de fusão da membrana do vírus com a membrana da célula hospedeira.

A literatura mostra uma gama de drogas que foram reposicionadas como potenciais agentes contra a infecção pelo ZIKV (BARROWS et al., 2016; JULANDER et al., 2017; PATTNAIK et al., 2018). A cloroquina por exemplo, é um antimalárico também utilizado para o tratamento de artrite reumatóide e lúpus. Além disso, tem sido prescrita profilaticamente para grávidas com risco de exposição à malária. Dados mostram que a cloroquina é capaz de atravessar a barreira placentária atingindo concentrações no plasma materno e fetal, sem gerar aborto, toxicidade fetal e nascimento com defeitos (MACKENZIE, 1983; WOLFE e CORDERO, 1985; PARKE, 1988; LEVY et al., 1991; LAW et al., 2008).

Em 2010, um grupo avaliou os benefícios do tratamento com a cloroquina em pacientes infectados por DENV. Observou-se que não houve redução na duração e na intensidade da viremia, entretanto houve sim uma redução no número de casos de febre hemorrágica da dengue no grupo tratado (TRICOU et al., 2010). Outro ensaio clínico posterior, demonstrou 60% dos pacientes infectados com DENV e tratados com a cloroquina, relataram sentir menos dor e melhora no desempenho das atividades diárias durante o tratamento (BORGES et al., 2013).

Diferentes mecanismos de inibição da infecção viral pela cloroquina já foram descritos, um deles é que ela age nas etapas dependentes de pH do processo de replicação (TSAI et al., 1990; OOI et al., 2006; ZHU et al., 2012; JUVENAL et al., 2013; BOONYASUPPAYAKORN et al., 2014). Estudos mostram que quando a droga foi adicionada logo após a infecção (0 hora) foi observado

redução na liberação de partículas do ZIKV, não tendo o mesmo efeito quando adicionada 24 horas após a infecção, sugerindo dessa forma que a cloroquina tem maior impacto nos estágios iniciais da infecção (MACKENZIE, 1983; TITUS, 1989; SAVARINO et al., 2003; ZYBERT et al., 2008; SMIT et al., 2011; BORGES et al., 2013).

Como mostrado pela literatura, o principal mecanismo de ação da cloroquina se dá devido a inibição da acidificação endossomal. Ainda tentando elucidar o mecanismo de ação dos derivados relacionamos a estrutura / atividade dos mesmos. Vimos que nossos derivados ativos possuíam em sua estrutura o grupamento Cloro (GQ394, ZKC3 e FT32). Atribuímos a adição desse grupamento como sendo responsável também pelo mecanismo de ação dos mesmos.

Investigando a possível correlação do grupamento bromo com a atividade dos derivados, encontramos o estudo de Chen e colaboradores (2017). Eles avaliaram a Bromocriptina, muito usado para o tratamento de acromegalia e mal de Parkinson, como possível antiviral contra o ZIKV. Procurando desvendar o mecanismo de ação desse medicamento, os autores constataram que a redução da expressão de RNA viral se dava ao bloqueio das proteínas não estruturais do vírus, NS2 e NS3. Dos nossos derivados que possuem o grupamento Bromo (GQ396, GQ402, ZKC2, ZKC8 e FT39), apenas os GQ402, e FT39, reduziram a carga viral do ZIKV e foram capazes de se ligar à proteína do envelope e à NS5, respectivamente.

Além dos grupamentos citados acima, alguns dos nossos derivados ativos também possuíam o radical Iodo em sua estrutura. Entretanto, não encontramos estudos na literatura relacionando esse grupamento à atividade antiviral de alguma droga ou derivado.

Segundo o estudo de Nitsche e Manvar, alguns dos nossos derivados ativos também possuíam em sua estrutura os mesmos substituintes que os híbridos avaliados por eles, como o cloro, benzil, metoxi e metil, diferenciando-se na posição ao qual os substituintes estão ligados. O que nos leva a crer que essas modificações possam atribuir atividade para esses derivados.

Além dos resultados demonstrados acima, pudemos observar duas diferentes situações. A primeira é que alguns derivados foram capazes de se ligar às proteínas NS5 e/ou do E na modelagem molecular, mas não interferiram na redução do número de cópias de RNA viral nos ensaios *in vitro*. Como alguns desses derivados eram difíceis de solubilizar, levantamos a hipótese de que devido a não solubilização dos derivados, esses não conseguiam penetrar na célula e desenvolver seu potencial papel antiviral. A segunda situação que constatamos foi que alguns derivados reduziram a carga viral do ZIKV, mas não foram capazes de se ligar às proteínas avaliadas pelo docking molecular. Para essa última constatação, levantamos duas hipóteses: a

primeira é de que os derivados possam agir sobre a replicação viral através de outros mecanismos de ação. Seja se ligando à outras proteínas que participam do processo replicativo ou que elas ajam sobre o sistema imune do hospedeiro, gerando um estado antiviral celular.

Os recentes avanços na descoberta de agentes candidatos contra o ZIKV e a nossa compreensão da doença em si, não são apenas cruciais para avançar no combate contra o ZIKV, como também será útil para o próximo surto do vírus. Embora a comunidade científica e as autoridades de saúde tenham dedicado esforços à busca de tratamentos para a infecção pelo ZIKV, ainda não há terapia específica aprovada para este flavivírus. Dessa forma, a busca para o desenvolvimento de agentes eficazes e específicos contra o vírus são essenciais, especialmente para a população de risco, gestantes e crianças.

6 CONCLUSÃO

Através do nosso estudo, pudemos descobrir e elucidar o mecanismo de ação de 4 novos derivados TZDs com ação contra o ZIKV. Os derivados FT32 e FT39 foram capazes de se ligar à proteína NS5 e reduzir a expressão do RNA viral, quando as células foram tratadas com os derivados após a infecção. GQ402 e ZKC4 se ligaram a proteína do envelope e reduziram a ação do vírus sobre a célula quando estas receberam os derivados previamente à infecção. Vimos também que a adição dos radicais cloro, bromo e iodo na estrutura dos nossos derivados lhes garantiram uma melhor atividade frente aqueles que não possuíam.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar o docking molecular sobre as proteínas demais proteínas não estruturais do ZIKV;
- Avaliar se os derivados ativos são capazes de modular a INF-I;
- Determinar se os derivados ativos são capazes de reduzir/inibir a replicação viral em camundongos infectados pelo ZIKV;

REFERÊNCIAS

AL-BARI, M.A.A. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol. Res. Perspect.* 5, 1–13, 2017.

AMARNATH, N.; GUO, Y.; HARBINSKI, F.; FAN, YH.; CHEN, H.; LUUS, L., et al. Novel arylsulfoanilide-oxindole hybrid as an anticancer agent that inhibits translation initiation. *J Med Chem.*, v. 47, n. 21, p. 4979–82, 2004.

AUBRY, M. et al. Inactivation of Zika virus in plasma with amotosalen and ultraviolet. *A illumination. Transfusion*, v. 56, n. 1, p. 33–40, 2016.

BALASUBRAMANIAN, A. et al. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Res.* 137, 141–150, 2017.

BARRETO-VIEIRA, D. F. et al. Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 111, n. 8, p. 532-534, 2016.

BARROWS, N. J. et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe*, v. 20, n. 2, p. 259–270, 2016.

BASARAB, M., et al. Zika virus. *BMJ*, London, 2016. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/352/bmj.i1049.long>>.

BEST, S.M. et al. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a Tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J. Virol.* 79, 12828–12839, 2005.

BOLDESCU, V. et al. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 565–586, 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à

infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 44 de 2017. v. 48, n. 41, 2017. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/dezembro/12/Boletim-2017-043-final.pdf> >

BONDE, C. G.; GAIKWAD, N. J. Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem.*, v. 12, p. 2151–61, 2004.

BORGES, M.C., CASTRO, L.A., and DA FONSECA, B.A.L. Chloroquine use improves dengue-related symptoms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 596–599, 2013.

BRASIL (Ministério da Saúde). Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/05/entenda-as-fases-de-testes-e-como-funcionara-a-vacina-contr-o-zika>.

BRECHER, M.; ZHANG, J.; LI, H. The flavivirus protease as a target for drug discovery. *Virologica Sinica*, v. 28, n. 6, p. 326–336, 2013.

BRITO, M. A. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n. 2, p. 159-168, 2011.

BROUTET, N. et al. Zika Virus as a Cause of Neurologic Disorders. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 16, p. 1506–1509, 21, 2016.

BROWNING, D.J., ed. *Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy*, Springer, New York. 2014.

BYLER, K. G.; OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. In-silico screening for anti-Zika virus phytochemicals. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 69, p. 78–91, 2016.

BYRD, C.M. et al. A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 15–25, 2013.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, 2015.

CAO, B. et al. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J. Exp. Med.* 214, 2303–2313, 2017.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.

CARDOSO CW. Et al. Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil, 2015.

CARNEIRO, B. M. et al. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology*, New York, v. 496, p. 215-8, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Types of Zika Virus Tests. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/laboratories/types-of-tests.html>.2016>.

CHÁVEZ, J. H. et al. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*, v. 38, n. 6, p. 613– 618, 2010.

CHUNG KY, DONG H, CHAO AT, SHI PY, LESCAR J, LIM SP. Higher catalytic efficiency of N-7-methylation is responsible for processive N-7 and 2'-O methyltransferase activity in dengue virus. *Virology* 402:52–60, 2010.

CONSOLI, A.; DEVANGELIO, E. Thiazolidinediones and inflammation. *Lupus*, v. 14, n. 9, p. 794-7, 2005.

COSCONATI, S., FORLI, S., PERRYMAN, A.L., HARRIS, R., GOODSSELL, D.S., and OLSON, A.J. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. *Expert Opin Drug Discov.* 5(6): 597-607. 10.1517/17460441.2010.484460, 2010.

CRÉANGE, A. Guillain-Barré syndrome: 100 years on. *Revue Neurologique*, v. 172, n. 12, p. 770–774, 2016.

CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; PATEL, N. S.; DI PAOLA, R.; IALENTI, A.; GENOVESE, T.; CHATTERJEE, P. K.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Rosiglitazone, a ligando f the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol*, v. 483, n. 1, p. 79-93, 2004.

DAFFIS, S. et al. 2'-O Methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, London, v. 46, n. 8, p. 452–6, 2010.

DA SILVA NETO, M. A. C.; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. *Topicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular*. [s.l.] Itabajara da Silva Vaz Junior, 2013.

DELANO, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, San Carlos, CA, <http://www.pymol.org>, 2002.

DELVECCHIO, R. et al. Chloroquine, an endocytosis blocking agent, inhibits Zika virus infection in different cell models. *Viruses* 8, 322, 2016.

DEVINYAK, O. HAVRYLYUK, DZIMENKOVSKY, B. and LESYK, “Computational Search for Possible Mechanisms of 4-Thiazolidinones Anticancer Activity: The Power of Visualization,” *Molecular Informatics*, vol. 33, no. 3, pp. 216-229, 2014.

DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*, San Francisco, v. 9, n. 10, 2014.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika vírus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, London, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

- DRIGGERS, R. W. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2016.
- DUAN W, SONG H, WANG H, CHAI Y, SU C, QI J, SHI Y, GAO GF. The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets. *The EMBO Journal*. 36: 919–933, 2017.
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.
- DURRANT, J. D; MCCAMMON, J. A; *J. Mol. Graphics Modell*. 29, 888–893, 2011.
- ENFISSI, A. et al. Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*, v. 387, n. 10015, p. 227–228, 2016.
- ENTRICAN G: Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J Comp Pathol*.126(2–3): 79–94, 2002.
- FAJARDO-SÁNCHEZ, E.; GALIANO, V.; VILLALAÍN, J. Spontaneous membrane insertion of a dengue virus NS2A peptide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 627, p. 56–66, 2017.
- FARIA, N. R. *et al*. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*. v. 351, n. 6280, p. 1-9, 2016.
- FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl Trop Dis*, San Francisco, v. 8, n.1, 2014.
- FRÖHLICH, E.; WAHL, R. Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones. *BioMed Research International*., p.14, 2015.
- FRUMENCE, E. et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology*, New York, v. 493, p. 217–226, 2016.

GANGULY, S.; MURUGESAN, S.; PRASANTHI, N.; ALPTÜRK, O.; HERMAN, B.; CREMER, N. S. Synthesis and Anti-HIV-1 Activity of a Novel Series of Aminoimidazole Analogs. *Lett Drug Des Discov.*, v. 7, n. 5, p. 318–23, 2010.

GOLAN, David E. et al. *Princípios de Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia.* Guanabara Koogan, 3ª edição, 2009.

GOODFELLOW, J. A.; WILLISON, H. J. Guillain–Barré syndrome: a century of progress. *Nature Reviews Neurology*, v. 12, n. 12, p. 723–731, 2016.

GUERBOIS, M. et al. Outbreak of zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis*, Chicago, v. 214, n. 9, p. 1349-1356, 2016.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Negl Trop Dis*, San Francisco, v. 6, p. 1477, 2012.

HAFEZ, H. N.; EL-GAZZAR, A-R. Synthesis and antitumor activity of substituted triazolo [4, 3-a] pyrimidin-6-sulfonamide with an incorporated thiazolidinone moiety. *Bioorg Med Chem Lett.*, v. 19, p. 4143–7, 2009.

HAMEL, R. et al. Biology of zika virus infection in human skin cells. *J Virol*, Washington, v. 89, p. 8880-96, 2015.

HENNESSEY M, FISCHER M, STAPLES JE. 2016. Zika virus spreads to new areas—region of the Americas.

HEUKELBACH, J. et al. Zika virus outbreak in Brazil. *J Infect Dev Ctries*, v. 10, n. 2, p. 116-120, 2016.

HUANG, W.; MO, X.; WU, X.; LUO, W.; CHEN, Y. Rosiglitazone suppresses HIV-1 Tat-induced vascular inflammation via Akt signaling. *Mol Cell Biochem.*, v. 407, p. 173–179, 2015.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2014.

ISSUR, M. et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA*, v. 15, n. 12, p. 2340–2350, 2009.

JADAV, S. S.; SINHA, B. N.; HILGENFELD, R.; PASTORINO, B.; LAMBALLERIE, X.; JAYAPRAKASH, V. Thiazolidone derivatives as inhibitors of chikungunya virus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 89, p. 172-178, 2015.

JULANDER, J. G. et al. Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. *Antiviral Res*, Amsterdam, v. 137, p. 14-22, 2017.

JUNIOR, V. L. P. et al. Vírus Zika : Revisão para Clínicos Zika Virus : A Review to Clinicians. v. 28, n. 6, p. 760–765, 2015.

JUVENAL, K., FARIAS, S., RENATA, P., MACHADO, L., AND ANTÔNIO, B. (2013). Chloroquine Inhibits Dengue Virus Type 2 Replication in Vero Cells but Not in C6 / 36 Cells. 2013.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia: Básica & Clínica*. 9 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KNIPE, D. M. et al. *Fields virology*. 6th. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

KOCHHAR DM, PENNER JD, KNUDSEN TB: Embryotoxic, teratogenic, and metabolic effects of ribavirin in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2(1): 99–112, 1980.

KOK, W. M. New developments in flavivirus drug discovery. *Exp Opin on Drug Discov*, v. 11, n. 5, p. 433-445, 2016.

KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO reports*, Oxford, v. 17, n. 12, p. 1766-1775, 2016.

LAURENT-ROLLE, M. et al. The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon. *Cell Host Microbe* 16, 314–327, 2014.

LAW, I., ILETT, K.F., HACKETT, L.P., PAGE-SHARP, M., BAIWOG, F., GOMORRAI, S., MUELLER, I., KARUNAJEEWA, H. A., AND DAVIS, T.M.E. Transfer of chloroquine and desethylchloroquine across the placenta and into milk in Melanesian mothers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 65, 674–679, 2008.

LAZEAR, H. M. et al. 2016, A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host & Microbe*, Cambridge, v. 19, p. 720–730, 2016.

LEE, Y. R. et al. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology*, New York, v. 374, n. 2, p. 240–8, 2008.

LEVY, M., BUSKILA, D., GLADMAN, D., UROWITZ, M., AND KOREN, G. Pregnancy Outcome Following First Trimester Exposure to Chloroquine. *Am. J. Perinatol.* 8, 174–178, 1991.

LI, C. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*, v. 19, n. 1, p. 120-126, 2016.

LI, Y. et al. Membrane topology of NS2B of dengue virus revealed by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1848, n. 10, p. 2244–2252, 2015.

LIM SP, NOBLE CG, SEH CC, SOH TS, EL SAHILI A, CHAN GK, et al. Potent allosteric dengue virus NS5 polymerase inhibitors: mechanism of action and resistance profiling. *PLoS Pathog*, 2016.

LIM SP, WEN D, YAP TL, YAN CK, LESCAR J., VASUDEVAN SG. Ascintillation proximity assay for dengue virus NS5 2'-O-methyltransferase-kinetic and inhibition analyses. *Antiviral Res* 80: 360–369, 2008.

- LIN, R.-J. et al. Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J. Virol.* 80, 5908–5918, 2006.
- LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields Virology*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 712–794, 2013.
- LUCAS-HOURANI, M. et al. Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog.* 9, e1003678, 2013.
- MAHARAJAN, M. K., et al., Zika Virus Infection: Current Concerns and Perspectives. *Clinic Rev Allerg Immunol.*, 2016.
- MALLET HP, VIAL AL, MUSSO D. 2015. Bilan de l'épidémie à virus Zika en Polynésie française, 2013–2014. French Polynesia outbreak of Zika in French Polynesia, 2013–2014.
- MANVAR, D.; KÜÇÜKGÜZEL, I.; ERENŞOY, G.; TATAR, E.; DERYABASOGULLAR, G.; REDDY, H.; TALELE, T. T.; CEVIK, O.; KAUSHIK-BASU, N. Discovery of conjugated thiazolidinone-thiadiazole scaffold as anti-dengue virus polymerase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 743-747, 2015.
- MARANO, G. et al. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blood Transfus*, v. 14, n. 2, p. 95-100, 2016.
- MARTINES, R. B. et al. Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, Washington, v. 65, n. 6, p. 159-160, 2016.
- MACKENZIE, A.H. Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials. *Am. J. Med.* 75, 40–45, 1983.

McCARTHY, M. Severe eye damage in infants with microcephaly is presumed to be due to Zika virus. *BMJ*, London, v. 352, n. 855, 2016.

MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*, v. 18, p. 324–333, 2017.

MENG, X.; ZHANG, H.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Curr Comput Aided Drug*. 7(2): 146–157. PMID:PMC3151162, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1139-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/zika/17874-manejo-clinico>>.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*, Boston, v. 374, p. 951-958, 2016.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking, *Methods Mol Biol*. 443: 365-382, Springer. 10.1007/978-1-59745-177-2_19, 2008.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia. *Euro Surveill*, Saint-Maurice, v. 19, n. 15, 2014.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V.; GUBLER, D. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet*, London, v. 386, n. 9990, p. 243–44, 2015.

NHAN TX, MUSSO D. 2015. The burden of chikungunya in the Pacific. *Clin Microbiol Infect* 21:e47–e48. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.018

NEMÉSIO, H.; PALOMARES-JEREZ, F.; VILLALAÍN, J. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: Membranotropic regions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1818, n. 11, p. 2818–2830, 2012.

NISSEN, S.E. and WOLSKI, K. “Effects of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes”. 2457–2471, 2007.

NIYOMRATTANAKIT P, CHEN YL, DONG H, YIN Z, QING M, GLICKMAN JF, LIN K, MUELLER D, VOSHOL H, LIM JY, NILAR S, KELLER TH, Shi PY. Inibição do vírus da dengue polimerase por bloqueio do túnel de RNA J. Virol. 84. pp. 5678 – 5686, 2010.

NITSCHKE, C.; SCHREIER, V. N.; BEHNAM, M. A.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R.; KLEIN, C. D. Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. J Med Chem., v. 56, n. 21, p. 8389-403, 2013.

NOBLE CG, CHEN YL, DONG H. , GU F. , LIM SP, SCHUL W, WANG QY, SHI PY. Estratégias para o desenvolvimento de inibidores do vírus da dengue Antivir. Res., 85. pp. 450 – 462, 2010.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. Cell Stem Cell, v. 18, n. 5, p. 591-6, 2016.

OOI, E.E., CHEW, J.S.W., LOH, J.P., AND CHUA, R.C.S. In vitro inhibition of human influenza A virus replication by chloroquine. Virol. J. 3, 39, 2006.

OLIVEIRA MELO, A. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, Carnforth, v. 47, p. 6-7, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Current Zika Product Pipeline (WHO, 2016). Disponível em: <<http://www.who.int/csr/research-and-development/zika-rd-pipeline.pdf>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Zika virus microcephaly and guillain-barré syndrome situation report, 19 Feb. 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204454/1/zikasitrep_19Feb2016_eng.pdf?ua=1>.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Zika - Epidemiological Report Brazil. June 2016. Washington, D.C.: OPAS/OMS, 2016.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). 2015. Epidemiological update. Zika virus infection. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com=doc_view&Itemid=270&gid=32021&lang=en>.

PARK, G.S. et al. Identification of residues critical for the interferon antagonist function of Langkat virus NS5 reveals a role for the RNA-dependent RNA polymerase domain. *J. Virol.* 81, 6936–6946, 2007.

PARKE, A.L. Antimalarial drugs, systemic lupus erythematosus and pregnancy. *J. Rheumatol.* 15, 607–610, 1988.

PERRYMAN, A.L., YU, W., WANG, X., EKINS, S., FORLI, S., LI, S.G., FREUNDLICH, J.S., TONGE, P.J., and OLSON, A.J. A Virtual Screen Discovers Novel, Fragment-sized Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis InhA. *J Chem Inf Model.* 55(3): 645-659. 10.1021/ci500672v, 2015.

PRABHAKAR, C.; MADHUSUDHAN, G.; SAHADEV, K.; MAHEEDHARA-REDDY, C.; SARMA, M.; REDDY, G. O., et al. Synthesis and biological activity of novel thiazolidinediones. *Bioorg Med Chem Lett.*, v. 8, p. 2725–30, 1998.

RANG, H.P, DALE, M.M. *Farmacologia*. Editora Guanabara Koogan, 6a edição, 2007.

RASKA K JR, ZEDECK MS, WELCH AD: Relationship between the metabolic effects and the pregnancy-interrupting property of 6-azauridine in mice. *Biochem Pharmacol.* 15(12): 2136–8, 1966.

RAUSCH, K. et al. Screening bioactives reveals nanchangmycin as a broad spectrum antiviral active against Zika virus. *Cell Rep.* 18, 804–815, 2017.

REDDY, K. A.; LOHRAY, B.; BHUSHAN, V.; REDDY, A. S.; KISHORE, P. H.; RAO, V. V., et al. Novel euglycemic and hypolipidemic agents: Part-2 antioxidant moiety as structural motif. *Bioorg Med Chem Lett.*, v. 8, p. 999–1002, 1998.

REZNIK, S. E.; ASHBY JR, C. R. Sofosbuvir: an antiviral drug with potential efficacy against Zika infection. *International Journal of Infectious Diseases*, Hamilton, v. 55, p. 29–30, 2017.

ROBINSON, W. E. et al. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. June, p. 6326–6331, 1996.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; BANDEIRA, A. C.; FRANCO-PAREDES, C. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, London, v. 15, p. 13, 2016.

SAHOO M, JENA L, DAF S, KUMAR S. Virtual screening for potential inhibitors of NS3 protein of Zika virus. *Genomics Inform.* 14:104–11, 2016.

SAIZ, J.-C. et al. Zika Virus: the Latest Newcomer. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. APR, 2016.

SAIZ, J.; MARTÍN-ACEBES, M. A. The Race To Find Antivirals for Zika Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 6, p. e00411-17, 2017b.

SALVADOR, F. S. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: new possibilities. *Travel Medicine Infectious Disease*, 2014.

SAMSA, M. et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 5, e1000632, 2009.

SAVARINO, A., BOELAERT, J.R., CASSONE, A., MAJORI, G., and CAUDA, R. Effects of chloroquine on viral infections_: an old drug against today ' s diseases_? *Lancet* 3, 722– 727, 2003.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SELISKO B, PEYRANE FF, CANARD B, ALVAREZ K, DECROLY E. Biochemical characterization of the (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity of dengue virus protein NS5 using purified capped RNA oligonucleotides (7Me)GpppAC(n) and GpppAC(n). J Gen Virol 91:112–121, 2010.

SHANKAR, A.; PATIL, A. A.; SKARIYACHAN, S. Recent Perspectives on Genome, Transmission, Clinical Manifestation, Diagnosis, Therapeutic Strategies, Vaccine Developments, and Challenges of Zika Virus Research. Frontiers in Microbiology, v. 8, n. September, p. 1761, 14, 2017.

SHARMA, N. et al. Epigallocatechin gallate, an active green tea compound inhibits the Zika virus entry into host cells via binding the envelope protein. Int. J. Biol. Macromol. 104, 1046–1054, 2017.

SIMPSON, D. I. Zika virus infection in man. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 58, n. 7, p. 335–338, 1964.

SMIT, J.M., MOESKER, B., RODENHUIS-ZYBERT, I., AND WILSCHUT, J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. Viruses 3, 160–171, 2011.

SMITH-BINDMAN, R. Is Computed Tomography Safe? New England Journal of Medicine, v. 363, n. 1, p. 1–4, 2010.

SMITH-BURN, K. C. Neutralizing antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of long-time residents of Malaya and Borneo. Am J Hyg, v. 59, p. 157–163, 1954.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. The Journal of Infectious Diseases, v. 216, n. suppl_10, p. S935–S944, 2017.

SOARES DE OLIVEIRA-SZEJNFELD, P. et al. Congenital Brain Abnormalities and Zika Virus: What the Radiologist Can Expect to See Prenatally and Postnatally. Radiology, p. 161584, 2016.

SOFIA, M. J. Nucleotide prodrugs for the treatment of HCV infection. *Adv Pharmacol*, New York, v. 67, p. 39–73, 2013.

SOLOMON, T.; BAYLIS, M.; BROWN, D. Zika virus and neurological diseases – approaches to the unknown. *Lancet Infectious Diseases*, New York. 16, n. 4, p. 402-404, 2016.

SONG, B.-H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, v. 308, p. 50–64, 2017.

SUNDURU, N.; SRIVASTAVA, K.; RAJAKUMAR, S.; PURI, S.; SAXENA, J.; CHAUHAN, P. Synthesis of novel thiourea, thiazolidinedione and thioparabanic acid derivatives of 4-aminoquinoline as potent antimalarials. *Bioorg Med Chem Lett.*, v. 19, p. 2570–3, 2009.

SWARUP, V. et al. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 9, p. 3367–3370, 2007

TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.

TEIXEIRA, M. G. et al. The epidemic of Zika virus-related microcephaly in Brazil: Detection, control, etiology, and future scenarios. *American Journal of Public Health*, v. 106, n. 4, p. 601–605, 2016.

TITUS, E. Recent developments in the understanding of the pharmacokinetics and mechanism of action of chloroquine. *Ther. Drug Monit.* 11, 369–379, 1989.

THOMAS, D. L. et al. Local Transmission of Zika Virus — Puerto Rico, November 23, 2015–January 28, 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, n. 6, p. 154–158, 2016.

TROTT, O., and OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 30;31(2):455-61. 10.1002/jcc.21334, 2010.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Current Opinion in Virology*, New York, v. 22, p. 30–35, 2017.

VENTURA, C. V. et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq Bras Oftalmol*, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 1-3, 2016.

VERSTEEG, G.A. and GARCI´A-SASTRE, A. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 508–516 36, 2010.

VINET, L.; ZHEDANOV, A. A “missing” family of classical orthogonal polynomials. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, 2010a.

WAKUI, Y.; INOUE, J.; UENO, Y.; FUKUSHIMA, K.; KONDO, Y.; KAKAZU, E.; OBARA, N.; KIMURA, O.; SHIMOSEGAWA, T. Inhibitory effect on hepatitis B virus in vitro by a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, rosiglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 508–514, 2010.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution; journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v. 9, n. 4, p. 523–540, 2009.

WOLFE, M.S., and CORDERO, J.F. Safety of chloroquine in chemosuppression of malaria during pregnancy. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* 290, 1466–1467, 1985.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZHAO, B. et al. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. Nature Communications, v. 8, p. 14762, 2017.

ZHANG, Z. et al. Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. Science, v. 354, n. 6319, p. 1597–1600, 2016.

ZHENG, H. et al. Molecular characterization of Japanese encephalitis virus strains prevalent in Chinese swine herds. Journal of veterinary science, v. 14, n. 1, p. 27–36, 2013.

ZMURKO, J. et al. The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. PLoS Negl Trop Dis, San Francisco, v. 10, n. 5, 2016.

ZYBERT, I. A., VAN DER ENDE-METSELAAR, H., WILSCHUT, J., and SMIT, J.M. Functional importance of dengue virus maturation: Infectious properties of immature virions. J. Gen. Virol. 89, 3047–3051, 2008.

ANEXO A – ARTIGO 1

New TZDs show activity against Zika virus in vitro

Sayonara Gonçalves^a, Lília Galdino^a, Morganna Lima^c, Maria Cecília Oliveira^b, Michelle Rosa^a, Rafael França^c, Moacyr Rêgo^{b*}, Ivan Pitta^b, Marina Pitta^b, Maira Pitta^a

^a*Laboratory of Immunomodulation and New Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco, Av. Moraes Rego, 1235, Recife, 50670-901, Brazil;*

^b*Pharmaceutical Planning and Synthesis Laboratory, Federal University of Pernambuco Av. Moraes Rego, 1235, Recife, 50670-901, Brazil;*

^c*Department of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation / FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, 1235, Recife, 50670-901, Brazil.*

*Corresponding author at: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

E-mail address: moacyr.rego@ufpe.br

ABSTRACT

In the present study, a series of thiazolidine-2-4-dione derivatives were synthesized (d1-d9). The antiviral activity and cytotoxicity of the compounds were tested against ZIKV in VERO cell culture. 5-(4-chlorobenzylidene)-3-(3-methoxybenzyl) thiazolidine-2,4-dione (d5) and 5-(2-bromobenzylidene)-3-(3-methoxybenzyl) thiazolidine-2,4-dione (d6) exhibited the most potent antiviral activity with a IC_{50} : 1,95 μ M (d5) and 3,24 μ M (d6) against ZIKV in VERO cell lines with index selective (IS): 92,87 (d5) and 24,46 (d6). The study implies that some of our derivatives may possess activity against Zika virus.

Keywords:

Zika inhibitors; Organic Synthesis; thiazolidine-2-4-dione derivatives; Antivirals.

Arboviruses are responsible for a group of diseases that play a role in the public health and economic balance worldwide. The contamination spreads over climate changes, sanitation matters, and deforestation, significantly increasing the population risk (1). It is well documented that the mosquito *Aedes aegypti* is a common vector of arboviruses such as dengue, yellow fever, Zika, and Chikungunya, some of these infection are endemic in tropical countries like Brazil (2-3).

The Zika virus (ZIKV) was responsible for a worldwide epidemic that overspread over 87 countries in 2019, leaving behind more than 500 000 suspected cases (4-5). The recent virus outbreaks in the Pacific, Brazil, and Africa have worried the general population. The virus induces an emerging infection generally associated with mild, non-specific symptoms and even asymptomatic characteristics (5). When present, the symptom includes, among others, general body pain in the articulation muscles and eyes, fatigue, fever, chills, and loss of appetite. Further, the infection may present a self-limited clinical picture by neurological syndromes such as the congenital ZIKV syndrome (SCZ) and Guillain Barré Syndrome (SGB). Zika is significant danger for pregnant women infected, arousing births defects, including microcephaly and even death (6,7).

Of note, in Brazil, between the epidemiological weeks (SEs) 45/2015 and 40/2019 (11/8/2015 to 10/5/2019). The Ministry of Health was notified of 18,282 suspected cases of changes in growth and development possibly related to Zika virus infection during pregnancy, 19.0% were confirmed. Among the confirmed cases, 2,969 (85.5%) were newborns or live children and 505 (14.5%) were fatal neonatal and infant deaths. Most of the notified cases were concentrated in the Northeast (56.9%) of Brazil, followed by the Southeast (26.1%) and Midwest (7.7%). The five states with the highest number of reported cases were Pernambuco (16.2%), Bahia (14.9%), São Paulo (10.3%), Rio de Janeiro (6.6%) and Paraíba (6.6 %) (8,9).

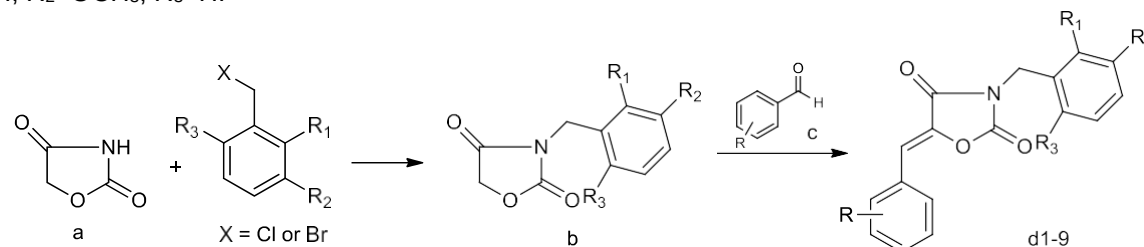
The vaccine therapy to Zika virus has not received much improvement in the last years. The treatment contains only prophylactic measures, including anti-inflammatories drugs along with fluid intake. It is newsworthy the required search for qualified antiviral compounds (10,11).

Thiazolidinediones (TZDs), known as glitazones, underlies a series of biological actions such as anti-inflammatory, antimalarial, antioxidant, antitumor, antimicrobial, antiproliferative and antiviral activity (12 - 24). Studies using TZDs and derivate have shown success in reducing viral load. Rosiglitazone has reveled to mitigate the number of virus particles in hepatitis B (25) and Human Immunodeficiency Virus -1 (HIV-1) (26). Appealing studies showed other TZD derivatives as protease and RNA polymerase inhibitors in the dengue and chikunguya infection diseases (27, 28).

Due to the urgent need for a better pharmacological tool to ZIKV treatment, ten molecules have been designed and synthesized by the Laboratory of Planning and synthesis of chemical molecules, at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE/ Brazil). All compounds have in their structure the thiazolidine (TZD) ring. In this study we tested antiviral activity of TZD derivate and suggested new outcome to the future of antiviral therapy, especially to Zika virus infection.

The compounds were designed and synthesized by the Laboratory of Design and Drug Synthesis (Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF), at the Federal University of Pernambuco, Brazil. Thiazolidine derivate were obtained through 3 reaction steps, as represented in scheme 1. Firstly, thiazolidine-2,4-dione (a) was N-alkylated in the presence of aromatic chlorides or bromides giving rise to a thiazolidine intermediate substituted in the position 3 (b). Finally, substituted aromatic aldehydes (c) reacted with the N-alkylated intermediate (b) to form the final compounds substituted at the position 5 of thiazolidine-2,4-dione (d1-9). Thiazolidine-2,4-dione (a) was obtained in a previous stage through a cyclization reaction between thiourea and chloroacetic acid. The final products were purified by successive washing with water, organic solvents or by recrystallization. For structural confirmation, nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon 13, infrared and mass spectrometry methods were used.

Scheme 1. Synthesis of thiazolidine derivatives **d1-9**. **d1-d2**: R₁=Cl, R₂=H, R₃=F; **d3-d4**: R₁=H, R₂=F, R₃=H; **b**, **d5-d9**: R₁=H, R₂=OCH₃, R₃=H.



General preparation of 3-(3-methoxybenzyl) thiazolidine-2,4-dione (b) - The KOH/Thiazolidine-2,4-dione/EtOH (1.0 eq) mixture was stirred at room temperature. After 20min, the 3-methoxybenzyl chloride reagent (1.0 eq) was added and kept under reflux and heated to 60° for 24h. After this period, the mixture was filtered and cooled for crystallization. **General preparation of 5-benzylidene-3-(3-methoxybenzyl)-thiazolidine-2,4-dione (d1-9)** - Compound 3-(3-methoxybenzyl) thiazolidine-2,4-dione (b) (1.0 eq) and the substituted aromatic aldehyde (1.0 eq) were refluxed in glacial acetic acid and heated to 110°C. When the temperature reached 110°C,

ammonium acetate was added. After this period, the mixture was filtered and cooled for crystallization.

The VERO Cells (*Cercopithecus aethiops* - African green monkey kidney cell line) was obtained from ATCC. The cells were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO™), supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) (GIBCO™) and 1% penicillin and streptomycin (PS) (GIBCO™) in a humidified chamber at 37°C with 5% of CO₂. Zika virus strain PE243/2015 (short for ZIKV/Sapiens/Brazil/PE243/2015) were obtained from Dr. Marli Tenório, researcher of Laboratory of Virology and experimental therapy – LaViTe – Aggeu Magalhães Institute / Fiocruz – PE. The viruses were passaged once in VERO cells to prepare stocks and were stored at -80°C in small aliquots. Titer of the stocks viruses were determined by plaque assay using VERO cells as described previously (30).

The viability of the derivative was tested through the MTT assay (Sigma Aldrich). For the procedure was used Vero cell line, 1×10^5 cells/well were seeded for 24 hours. The plated cells were infected or not with ZIKV (MOI = 0.5) and treated with thiazolidine derivatives in different concentrations (10-200 µM) in 96-well plates. Wells were also used as controls I) with cells only, II) cells infected with ZIKV, III) vehicle control of the drug 0.1% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) and IV) Chloroquine was used as a positive drug control (12). After 72 hours of incubation at 37°C, 20 µl of MTT solution was added (0,5 mg/mL). The MTT incubation was 3 hours, the MTT formazan crystals were solubilized by the addition of 130 µl of 20% Sodium Dodecyl Sulfate – SDS solution (Sigma Aldrich). The absorbance was read on a plate spectrophotometer at 570 nm (BioTek EL 808) after 24 hours of incubation. Subsequently, the % of surviving cells was calculated and the inhibitory concentrations (IC₅₀), cytotoxic concentrations (CC₅₀) were defined and, consequently, the selectivity index (IS) of each evaluated compound was determined. The selectivity index (IS) was obtained by the ratio between the CC₅₀ and IC₅₀ values. Three independent experiments were carried out, all in triplicate of conditions.

After evaluating the parameters of viability and cytotoxicity, we traced the cutoff point of the IS > 2 to select the derivatives for the next tests. To assess whether the derivatives were able to interfere in the intracellular stages of viral replication (treatment after infection) or cell entry (treatment before infection), we performed the following culture protocols:

i) Treatment after infection - Cells were kept in the incubator for 24 hours to proper adhesion. Afterward, the cells were infected with ZIKV (MOI = 0.5) and placed again in the incubator for 2 hours for viral adsorption. After this time, the inoculum was removed and 50 µl of each derivative

was added in their respective concentrations. Then 150µl of culture medium was added, completing the final volume to 200µl and were again incubated for 72h. After 24, 48 and 72 hours, the supernatants were collected and stored at -80 ° C for further analysis.

ii) Treatment before infection - To assess whether the new derivatives would have the ability to protect VERO cells against infection by ZIKV, they were seeded in 96-well plates at a concentration of 1×10^5 cells per well. After 24 hours of incubation, the cells were treated with the new derivatives, in their respective doses for 6 hours. After this period, the cells were infected with ZIKV (MOI = 0.5), and then incubated for 2 hours for viral adsorption. After this time, the inoculum was removed and 200µl of culture medium was added, the plates were incubated again for up to 72 hours. After 6, 24, 48 and 72 hours, the supernatants from each respective time were collected and stored at -80°C for further tests.

Total RNA was extracted from cell culture supernatants using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany). The process of extraction was conducted according to protocol provided by the manufacturer. After extraction, the RNAs were stored at -80°C until RT-qPCR was performed. RT-qPCR was performed to quantify the viral RNA present in the culture supernatants. Laciotti et al., 2008, previously described the primers used in this set of experiments. The protocol used was established by the Center for Virology and Experimental Therapies (Fiocruz). For the RT-qPCR reactions, the QIAGEN one step RT-qPCR kit was used.

Statistical analysis was performed to assess differences in reducing the number of viral copies in infected cells treated with the chemical compounds, at different concentrations and time intervals of administration. The analysis compared the treated cells with no treated ones. The data were quantified using two-way ANOVA test. The CC_{50} values were generated by the Origin software and IC_{50} by GraphPad Prism®, version 6. The data were expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The data reflect: * $p < 0.05$ for the highest concentration of the tested derivative. * @ $p < 0.05$ for the two highest concentrations of the tested derivative.

The TZDs derivatives were added in VERO cells in doses of 5, 10, 50, 100 and 200 µM to verify cell viability in the presence or absence of virus. Initially, the cytotoxic concentration (CC_{50}) and the inhibitory concentration (IC_{50}) of the molecules were determined (Table 1). The low level of cell cytotoxicity is an essential criterion for drug development, suggesting the most efficient concentration with no cell damage. The new compounds d2, d5, d6 and d8 showed significantly cell protection in micromolar levels. d5 appears to have a distinguished potency with a high IS

value. d6 and d8 exhibited good cell protection values and acceptable IS. Although, d2 indicates good CC₅₀ values, it did not demonstrate a significant influence on the virus replication, revealing lower IS than d6 and d8 molecule. The compounds d4 and d7 despite low cytotoxicity, they demonstrated little effect against ZIKV with IC₅₀ values >100µM. The compounds d1, d3 and d9 showed significant cytotoxicity with CC₅₀ values below 50µM. Therefore, we did not precede with the assessment of the effective dose for d1, d3 and d9 molecules. Chloroquine used as a positive control, demonstrated selectivity against ZIKV. Also, it showed increased specificity to ZIKV compared to the compounds d2 e d6 (IS=8,24 e 24,46 respectively). In our hands, d5 showed 3 times more selectivity to virus than Chloroquine and d8 computed a similar outcome.

Table 1. The CC₅₀, IC₅₀ and SI values of the new derivatives against ZIKV virus in VERO cell.

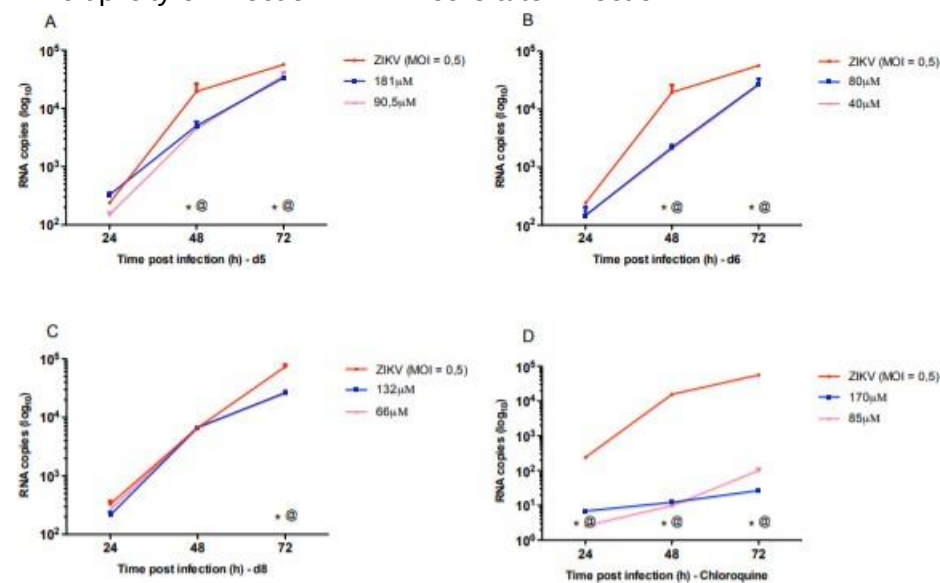
Legend: ^aCC₅₀: Cytotoxic concentration of the derivatives to cause death in 50% of viable cells. ^bIC₅₀: Concentration to inhibit 50% of ZIKV virus growth. ^cSI: Selectivity Index CC₅₀ / IC₅₀. ^dND: Not determined (not selected analyzes due to cytotoxicity levels). The data represent the mean ± SD of 3 independent experiments.

Compound	Cell Viability	anti-ZIKV activity	
	CC ₅₀ (µM) ^a	IC ₅₀ (µM) ^b	SI ^c
b	170,98 ± 0,54	>100	<2,00
d1	12,05 ± 0,94	ND ^d	ND
d2	153,04 ± 0,24	18,56 ± 0,22	8,24
d3	37,60 ± 0,06	ND	ND
d4	111,92 ± 0,018	>100 ^e	<2,00
d5	181,10 ± 0,018	1,95 ± 0,5	92,87
d6	79,26 ± 0,07	3,24 ± 0,03	24,46
d7	168,32 ± 0,07	>100	<2,00
d8	132,38 ± 0,06	3,73 ± 0,72	35,38
d9	47,95 ± 1,2	ND	ND
Chloroquine	170,50 ± 0,8	5,6	30,44

From to the experiments above, we selected d5, d6 and d8 as the most promising candidates to verify their effect on the ZIKV RNA expression. The test was carried out in two moments: firstly, VERO cells were infected with ZIKV. The cells were treated with the two highest concentrations of each respective derivative (d5, d6, d8 and chloroquine) up to 72 hours. As signed in the figure 1, d5 and d6 revealed a significant suppression in RNA synthesis of ZIKV at 48 hours with the

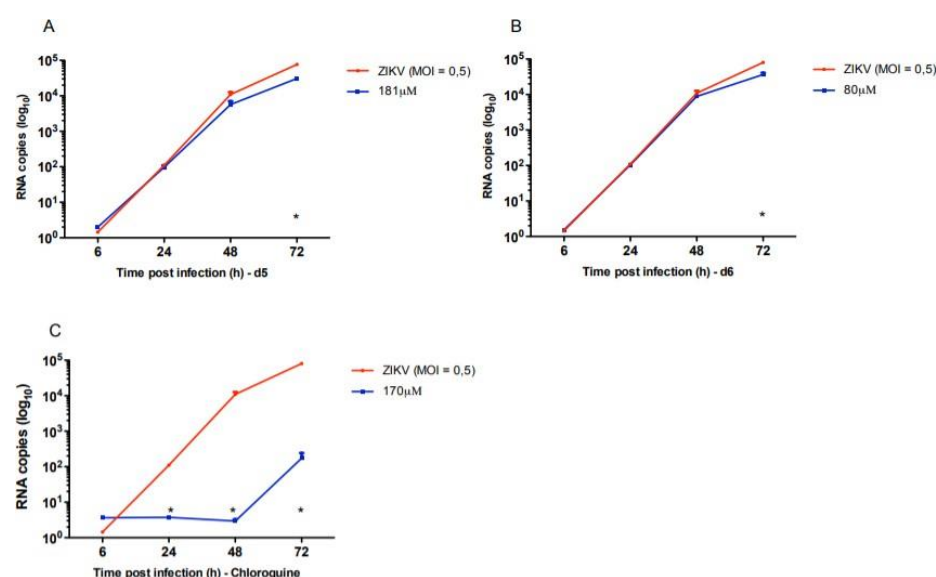
concentrations tested. Whereas d8 derivate displayed a subtle reduction in virus RNA expression in 72 hours of incubation with virus. Chloroquine potentially reduced the virus RNA synthesis at all times evaluated.

Figure 1 – Expression of ZIKV RNA in the presence of TZD derivate after infection. VERO cells were treated with the derivatives in their two highest concentrations and maintained in culture for up to 72hpi. Every 24hpi, the culture supernatant was collected and stored for later extraction of RNA and analysis at RTqPCR for the RNA copies. The data reflect the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments, all in triplicate. P was considered statistically significant when <0.05 ; * represents the significance to highest concentration and @ to the smallest tested, compared to MOI. Caption: (A) Treatment with d5 derivative. (B) Treatment with d6 derivative. (C) Treatment with the d8 derivative. (D) Treatment with positive drug control, chloroquine. MOI - Multiplicity of infection. HPI - hours after infection.



In the second step, d5 and d6 were added in culture before the ZIKV infection and tested for their efficacy in inhibits the entry of virus into the cells. As shown in the figure 2, d5 and d6 derivatives did not interferes in the ZIKV virus cell entrance and consequently, in this experimental conditions d5 and d6 did not change the numbers of viral copies, differently than Chloroquine. We did not quantified a significant d8 antiviral activity, thus the molecule was excluded from posterior analysis.

Figure 2 – Number of copies of viral RNA. VERO cells were treated with the derivatives for 6 hours. After the period, the cells were infected with ZIKV (MOI = 0.5) and maintained in culture for up to 72hpi. At every 24hpi, the culture supernatant was collected and stored for later extraction of RNA and analysis of RTqPCR. The data reflect the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments, all in triplicate P was considered statistically significant when <0.05 ; * significance of virus RNA load compared to MOI. Caption: (A) Treatment with d5 derivative. (B) Treatment with d6 derivative. (C) Treatment with the positive control, chloroquine. MOI - Multiplicity of infection. HPI - hours after infection.



Previous studies have shown that TZD retains inhibitory activity against ZIKV, beyond other viruses such as dengue and chikungunya virus in micromolar concentrations (27,28). In this study, we lodged potential candidates that might ameliorate future studies for the treatment of ZIKV infection. In our hands, the derivatives d5, d6 and d8 displayed efficient CC₅₀ and IC₅₀ levels producing an IS above 25, especially the G6 (92.87). The IS values suggest that the molecules might predict an antiviral activity. Additionally, d5 and d6 significantly impaired RNA synthesis after culture contamination with ZIKV, whereas did not yield efficacy on replication levels prior of virus transfection in VERO cell line. One must say that the molecules are not applicable for prophylactic measures, once they did not prevent the virus entry into the cells. The impairment of RNA synthesis was predominantly driven by d5 and d6 derivate, such an activity more efficient than Chloroquine, the positive control. We did not quantified a significant d8 antiviral activity.

Our compounds have in common the active nucleus of tizaolidine-2,4-dione (TZD). The difference among them is at the substituents on the aromatic rings attached at 3 and 5 position of the TZD ring. Compounds d1 and d2 have 2-Cl and 6-F substituents; d3 and d4 have 2-F; while d9 has the 3-OCH₃ linked to the *N*-benzylidene ring. Compounds d5 and d6 stood out in the suppression of ZIKV RNA synthesis. d5 was synthesized with *p*-Cl group in the position 5 of TZD ring, whereas d6 with *o*-Br.

Nitsche et al., 2013 and Manvar et al., 2015, evaluated thiazolidine derivatives against the dengue virus. Concordantly with our results, the authors saw a decrease on virus replication by the

inhibition of NS5 protease with the use of thiazolidine derivatives. The molecules exhibited similar structure of ours; Cl was also allocated in the structure, suggesting an effect based on substitutes in the aromatic ring. A study published in 2017 collected 700 compounds focused on their protease inhibition activity against West Nile virus (WNV). Among them, the compound, NSC157058 (IC₅₀ = 0.82μM) decreased tenfold the WNV RNA levels *in vitro* and *in vivo* studies (31). As WNV, dengue, and ZIKV belong to the same virus family, the aforementioned data cement the merit of the compounds here studied.

Diseases spread by viruses are one of the major causes of human pathology and mortality. Infectious agents may even become established in human populations (32). There is no vaccine or effective treatment for ZIKV, new virus outbreaks are yet to come, consequently, researchers must ensure the development of alternatives to impair the impact of endemic crisis. Our results propose TDZ derivate as new agents for antiviral activity against ZIKV. Further studies must underlie the signaling required for the antiviral activity of the compounds, as much as further analysis of toxic effect must be performed.

Conclusion

In the middle of a worldwide necessity, this study explored the antiviral activity of TDZ derivates against ZIKV infection. Compounds chemically synthesized showed a potent decrease of viral ZIKV RNA levels, without impair virus entry in VERO cells line. The results here suggest new agents with the potential to impair ZIKV virus replication and spreading diseases, as well as raise expectations for novels chemotype against ZIKV virus.

Acknowledgments

This study was contemplated by the CALL MCTIC / FNDCT - CNPq / MEC-CAPES / MS-Decit N ° 14/2016, Prevention and Combat to the Zika Virus. Financed by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Appendix A. Supplementary data

References

1. Hamel, R. et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol*, **2015**; 8880-96.
2. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **1952**; 509–520.
3. Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **1954**; 139–145.
4. Faye O, Freire CC, Iamarino A, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl Trop Dis.* **2014**; 2636.
5. BE - Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika situação epidemiológica, ações desenvolvidas e desafios de 2015 a 2019).
6. Johansson MA, Mier-y-Teran-Romero L, Reefhuis J, et al. Zika and the risk of microcephaly. *N Engl J Med.* **2016**; 1–4.
7. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* **2016**; 487–524.
8. organização pan americana de saúde / organização mundial de saúde. Zika - Epidemiological Report Brazil. June 2016. Washington, D.C.: OPAS/OMS, **2016**.
9. OPAS Organização Panamericana de Saúde (OPAS), Epidemiological update. Zika virus infection, **2015**.
10. Tong X, Smith J, Bukreyeva N, et al. Merimepodib, an IMPDH inhibitor, suppresses replication of Zika virus and other emerging viral pathogens. *Antiviral Res.* **2018**; 34–40.
11. Xu M, Lee EM, Wen Z, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med.* **2016**; 1101–1107.
12. Delvecchio R, Higa LM, Pezzuto P, et al. Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. *Viruses.* **2016**; 322.
13. Carneiro, B. M. et al. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology, New York.* **2016**; 215-8.
14. Julander, J. G. et al. Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. *Antiviral Res, Amsterdam.* **2017**; 14-22.
15. Reznik, S. E.; Ashby JR, C. R. Sofosbuvir: an antiviral drug with potential efficacy against Zika infection. *International Journal of Infectious Diseases, Hamilton.* **2017**; 29–30.
16. Barrows, N. J. et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe.* **2016**; 259–270.

17. Sofia, M. J. Nucleotide prodrugs for the treatment of HCV infection. *Adv Pharmacol*, New York. **2013**; 39–73.
18. Zmurko, J. et al. The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Negl Trop Dis*, San Francisco. **2016**.
19. Prabhakar C; Madhusudhan G; Sahadev K, et al. Synthesis and biological activity of novel thiazolidinediones. *Bioorg Med Chem Lett*. **1998**; 2725–30.
20. Sunduru N; Srivastava K; Rajakumar S, et al. Synthesis of novel thiourea, thiazolidinedione and thioparabanic acid derivatives of 4-aminoquinoline as potent antimalarials. *Bioorg Med Chem Lett*. **2009**; 2570–3.
21. Reddy KA; Lohray B; Bhushan V; Reddy AS, et al. Novel euglycemic and hypolipidemic agents: Part-2 antioxidant moiety as structural motif. *Bioorg Med Chem Lett*. **1998**; 999–1002.
22. Hafez HN; EL-Gazzar AR. Synthesis and antitumor activity of substituted triazolo [4, 3-a] pyrimidin-6-sulfonamide with an incorporated thiazolidinone moiety. *Bioorg Med Chem Lett*. **2009**; 4143–7.
23. Bonde CG; Gaikwad NJ. Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem*. **2004**; 2151–61.
24. Amarnath N; Guo Y; Harbinski F, et al. Novel arylsulfoanilide-oxindole hybrid as an anticancer agent that inhibits translation initiation. *J Med Chem*. **2004**; 4979–82.
25. Wakui Y; Inoue J; Ueno Y, et al. Inhibitory effect on hepatitis B virus in vitro by a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, rosiglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2010**; 508–514.
26. Huang W; Mo X; Wu X, et al. Rosiglitazone suppresses HIV-1 Tat-induced vascular inflammation via Akt signaling. *Mol Cell Biochem*. **2015**; 173–179.
27. Nitsche C; Schreier VN; Behnam MA, et al. Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. *J Med Chem*. **2013**; 8389-403.
28. Manvar D; Küçükgülzel I; Erensoy G, et al. Discovery of conjugated thiazolidinone-thiadiazole scaffold as anti-dengue virus polymerase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2015**; 743-747.
29. Pitta, MGR et al., Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. *Med Chem Res*. **2013**; 2421-2429.

30. Annamalai, A.S et al. Zika virus encoding non-glycosylated envelope protein is attenuated and defective in neuroinvasion. *J. Virol.* **2017**; 01348–17.
31. Shiryayev, S.A. et al. Characterization of the Zika virus two-component NS2B-NS3 protease and structure-assisted identification of allosteric small-molecule antagonists. *Antiviral Res.* **2017**; 218–229.
32. Richard J.Kuhn et al. structure of dengue virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. **2002**; 717-725.
33. Buchanan, J. G.; Sable, H. Z. In *Selective Organic Transformations*; Thyagarajan, B. S., Ed.; Wiley-Interscience: New York, **1972**; 1–95.
34. Lyle, F. R. U.S. Patent 5 973 257, 1985; *Chem. Abstr.* **1985**; 2870.