

**JOÃO VITOR DA SILVA RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIVIRAL DE COMPOSTOS 1,2,3-  
TRIAZÓLICOS DERIVADOS DA VANILINA CONTRA O ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R696a  
2021  
Rodrigues, João Vitor da Silva, 1996-  
Avaliação do potencial efeito antiviral de compostos  
1,2,3-triazólicos derivados da vanilina contra o Zika vírus / João  
Vitor da Silva Rodrigues. – Viçosa, MG, 2021.  
81 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Vírus da Zika. 2. Vanilina. 3. Agentes Antivirais.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 614.5885

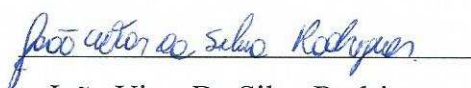
**JOÃO VITOR DA SILVA RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIVIRAL DE COMPOSTOS 1,2,3-  
TRIAZÓLICOS DERIVADOS DA VANILINA CONTRA O ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 9 de março de 2021

Assentimento:



João Vitor Da Silva Rodrigues  
Autor



Sérgio Oliveira de Paula  
Orientador

Aos meus pais, Luzia Railda e João Rodrigues, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral pela estrutura para realização da pesquisa e pelo apoio na formação acadêmica e profissional.

A Deus e a Nossa Senhora das graças pela proteção e intercessão nesta jornada única e extraordinária.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À minha família, pelo apoio, paciência, incentivo e amor durante todos esses anos da vida acadêmica, em especial a minha mainha que nunca mediu esforços para me proporcionar oportunidades únicas e por todo amor e paciência.

Ao meu orientador Sérgio Oliveira de Paula, pela confiança no meu trabalho e pelo ótimo convívio durante esses anos do mestrado.

Ao professor Roberto Sousa Dias, pela parceria, disposição e ensinamentos, essenciais para minha manutenção na área acadêmica.

As minhas amigas, Luana, Ariane, Thaina e Manu ( Winx), pelo ombro amigo, risadas e choros compartilhados. ‘I’ll be there for you’.

Aos amigos do laboratório de Imunovirologia Molecular, pela paciência, companheirismo, aprendizado e diversão, em especial a José, Jhon, Paloma, Isa e Marcelinha que me abraçaram desde o início e foram essenciais em transformar o laboratório num ambiente reconfortante.

Aos queridos, Iago e Ítalo, por toda ajuda e dedicação nos experimentos que com certeza não se concretizariam sem tamanha parceria.

Aos professores Róbson Ricardo Teixeira, Sabrina de Azevedo Silveira, Eduardo de Almeida Marques da Silva e Leandro Licursi pela disponibilidade e ensinamentos.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Celular e a pessoa da Beth por todo carinho e ajuda em meio ao caos que é o rápido período do mestrado.

Aos demais professores do Departamento de Biologia Geral pela atenção, aulas maravilhosas e suporte.

“O transfeminismo, algumas raras vezes chamado de feminismo transgênero, prolifera pela internet, anuncia-se em blogs e se confraterniza em redes sociais, e pode ser definido como uma linha de pensamento e de prática feminista que rediscute a subordinação morfológica do gênero ( como construção psicossocial) ao sexo ( como biologia), condicionada por processos históricos, criticando-a como uma prática social que tem servido como justificativa para a opressão sobre quaisquer pessoas cujos corpos não estão conformes à norma binária homem/pênis e mulher/vagina”.

(Jaqueline Gomes de Jesus )

## RESUMO

RODRIGUES, João Vitor Da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Avaliação do potencial efeito antiviral de compostos 1,2,3-triazólicos derivados da vanilina contra o Zika vírus.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

O vírus da Zika (ZIKV) pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, foi isolado primeiramente de macacos *resus* em 1947 na floresta Zika em Uganda e desde então obteve disseminação favorável nas Américas. Devido às inúmeras infecções e complicações clínicas em populações humanas, favorecido pela ampla distribuição do mosquito vetor e à subnotificação dos casos, sobretudo, devido à relação próxima com outros *Flavivirus* (dengue, chikungunya e febre amarela), se tornou um arbovírus de impacto significativo na saúde pública. No Brasil a linhagem predominante de circulação é a asiática, que vem promovendo surtos desde 2015 e está diretamente relacionado a Microcefalia em neonatos, já em adultos causa a Síndrome de Guillain-Barré. Recentemente, em meados do final de 2018 e início de 2019, pesquisadores identificaram cepas da linhagem africana circulando no Brasil com potencial de provocar uma nova epidemia. Atualmente não existe tratamento específico para febre do Zika, estando disponível apenas analgésicos e antitérmicos para alívio dos sintomas e bem estar dos pacientes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito antiviral de compostos 1,2,3 triazólicos derivados da vanilina e estabelecer seus mecanismos de ação contra o ZIKV. Os resultados demonstram que derivados triazólicos da vanilina foram estatisticamente significativos na redução da atividade viral do ZIKV in vitro, agindo diretamente sobre a partícula viral. Conclui-se portanto que compostos derivados da vanilina contendo núcleos 1,2,3 triazólicos podem ser drogas antivirais promissoras contra o ZIKV.

Palavras chave: Zika vírus. Vanilina. Antiviral.

## ABSTRACT

RODRIGUES, João Vitor Da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2021. **Evaluation of the potential antiviral effect of 1,2,3-triazolic compounds derived from vanillin against zika virus.** Advisor: Sérgio Oliveira de Paula.

The Zika Vírus (ZIKV) belongs to the Flaviviridae family and Flavivirus genus, was isolated first from rhesus monkey in 1947 in Zika forest in Uganda and since then obtained favorable dissemination in the Americas. Due to the countless infections and clinical issues in human populations, favored by wide distribution of insect vector and underreporting of cases by closer relation with other Flavivirus (dengue, chikungunya and yellow fever virus), it becomes an arbovirus with significant impact on public health. In Brazil the predominant strain of circulation is the Asian promoting outbreaks started in 2015 and directly related with microcephaly in newborns and Guillain-Barre syndrome in adults. Recently researchers identified a new African strain circulating in Brazil in mid-end 2018 and beginning of 2019, with potential to provoke a new epidemic. There is no specific treatment for Zika syndrome so far, just available analgesics and anti-thermal for relief of symptoms and well-being of patients. Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential antiviral effect of compounds 1,2,3 triazoles from vanillin and its action mechanisms against ZIKV. The results demonstrate that vanillin triazole derivatives were statistically significant in reducing the viral activity of ZIKV in vitro, acting directly on the viral particle. It is therefore concluded that compounds derived from vanillin containing 1,2,3 triazole nuclei may be promising antiviral drugs against ZIKV.

Keywords: Zika virus. Vanillin. Antiviral.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO .....	13
2.1 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA .....	13
2.2 VIROLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS ZIKA .....	15
2.3 TRANSMISSÃO.....	21
2.3.1 TRANSMISSÃO PELA PICADA DE MOSQUITOS COMPETENTES.....	21
2.3.2 TRANSMISSÃO SEXUAL.....	22
2.3.3 TRANSMISSÃO SECUNDÁRIA ( MATERNO-FETAL E POR TRANSFUSÃO SANGUÍNEA) .....	24
2.4 NEUROPATOLOGIAS ASSOCIADAS AO ZIKV.....	24
2.4.1 SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA E MICROCEFALIA .....	25
2.4.2 SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ ASSOCIADA AO ZIKV.....	27
2.5 DIAGNÓSTICO E DETECÇÃO DO ZIKV.....	29
2.6 TRATAMENTO .....	30
2.6.1 VACINAS .....	31
2.6.2 ANTIVIRAIS.....	33
2.6.3 VANILINA E OS NÚCLEOS 1,2,3 TRIAZÓLICOS .....	35
3 REFERÊNCIAS .....	37
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIVIRAL DE COMPOSTOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS DERIVADOS DA VANILINA CONTRA O ZIKA VÍRUS.....	47
RESUMO .....	48
ABSTRACT.....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	50
4.1 SINTESE DOS DERIVADOS DA VANILINA COM NÚCLEOS TRIAZÓLICOS .....	50
4.2 CULTURA CELULAR E ESTOQUE VIRAL.....	50
4.3 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO VIRAL.....	50
4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE .....	51
4.5 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL PELO ENSAIO VIRUCIDA .....	51
4.6 ENSAIO DOS MECANISMOS DE AÇÃO .....	52
4.7 ENSAIO DE PRÉ TRATAMENTO E PROTEÇÃO CELULAR .....	52
4.8 ENSAIO DE PÓS TRATAMENTO .....	53
4.9 ENSAIO DA INIBIÇÃO DA ADSORÇÃO.....	53
4.10 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO .....	54

4.11 ENSAIO VIRUCIDA TEMPO DEPENDENTE .....	54
4.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	55
4.13 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA.....	55
4.14 ESTUDO DE MODELAGEM COMPUTACIONAL- DOCKING.....	55
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
5 RESULTADOS.....	57
5.1 CITOTOXICIDADE E ÍNDICES DE SELETIVIDADE.....	57
5.2 DERIVADOS 1,2,3 TRIAZÓLICOS DA VANILINA INTERAGEM COM A PARTÍCULA VIRAL E REDUZ A INFECTIVIDADE DO ZIKA IN VITRO.....	60
5.3 A INTERAÇÃO PRÉVIA COM A PARTÍCULA VIRAL É FUNDAMENTAL PARA UMA SIGNIFICANTE REDUÇÃO DA INFECTIVIDADE DO ZIKA IN VITRO .....	63
5.4 O EFEITO VIRUCIDA SOBRE A PARTÍCULA VIRAL BLOQUEIA OS MECANISMOS INICIAIS DE ENTRADA E IMPEDE A CONTINUIDADE DO CICLO INFECCIOSO DO ZIKA .....	64
5.5 A INTERAÇÃO COM A PARTÍCULA VIRAL E A REDUÇÃO DA ATIVIDADE DO ZIKA É TEMPO DEPENDENTE.....	65
5.6 A AÇÃO VIRUCIDA SOBRE A PARTÍCULA DE ZIKA NÃO INDUZ PERTURBAÇÃO APARENTE NO ENVELOPE VIRAL .....	66
5.7 SIMULAÇÃO DE DOCKING MOLECULAR INDICA INTERAÇÃO EM SÍTIOS ESTRATÉGICOS DA PROTEÍNA E DO ENVELOPE DE ZIKA .....	67
5.8 A ENERGIA FAVORÁVEL DE INTERAÇÃO ENTRE AS REGIÕES DA EXTREMIDADE E CENTRAL DA PROTEÍNA E DO ZIKA É DEVIDO ÀS INTERAÇÕES COM RESÍDUOS ESTRATÉGICOS PRESENTES NOS DOMÍNIOS I, II e III.....	68
5.9 A REDUÇÃO NA CARGA DAS PARTÍCULAS DE ZIKA TRATADAS CONFIRMAM A INTERAÇÃO COM O COMPOSTO TESTE.....	71
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÕES.....	77
8 REFERÊNCIAS .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV) foi isolado primeiramente em 1947 na floresta do Zika em Uganda (Dick, Kitchen et al. 1952) . É um vírus pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que possuem 53 espécies de vírus reconhecidas com um total de 40 espécies promovendo infecção em seres humanos (Sharma, Sharma et al. 2020). São caracterizados por possuírem um genoma de RNA de polaridade positiva atuando como RNA mensageiro que codifica uma única poliproteína que é rapidamente clivada em 10 proteínas individuais (Lin, Yip et al. 2018). Estas proteínas são necessárias para a formação da partícula viral infecciosa, compreendendo três proteínas estruturais: do envelope (E); da membrana (M), presentes na bicamada lipídica que envolve o capsídeo, que por sua vez é formado pela proteína do capsídeo (C) que mantém contato com o genoma viral denominado ribonucleocapsídeo. Além de sete proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Golubeva, Nepomuceno et al. 2020). Os vírus da zika, dengue (DENV), febre Amarela (YFV), o do nilo ocidental representam os membros mais conhecidos e de maior impacto econômico deste gênero, com distribuição global devido a sua transmissão por artrópodes como mosquitos (Best 2016).

A febre do Zika está entre as doenças emergentes do século XXI de maior impacto para a saúde pública (Kazmi, Ali et al. 2020). Essa doença apresenta manifestações clínicas inespecíficas bem semelhantes a infecções por outros flavivírus como é o caso da Dengue, em que os pacientes apresentam sintomas que podem durar uma semana como por exemplo febre, artralgia, erupção cutânea e edemas (Paixao, Barreto et al. 2016). Apesar das manifestações clínicas brandas a infecção pelo ZIKV em gestantes pode levar a perda fetal, microcefalia congênita ou outras anomalias cerebrais graves (Pomar, Musso et al. 2019). E em adultos está associado a Síndrome de Guillain- Barré (SGB), encefalopatia, meningoencefalite, mielite, trombocitopenia grave associado a um pior prognóstico e sobrevida de pacientes (Hills, Fischer et al. 2017). Além disso diferentemente de outros flavivírus, outras rotas de transmissão são documentadas para o vírus Zika, incluindo exposição sexual, intra-uterina, perinatal, laboratorial e provavelmente transfusão de sangue (Masmajan, Musso et al. 2020).

Atualmente não há um tratamento específico para a infecção pelo vírus do Zika, sendo os tratamentos atuais baseados em analgésicos para alívio dos sintomas e bem estar dos

pacientes (da Silva, Oliveira Silva Martins et al. 2018). Portanto alguns estudos vêm sendo realizados com o intuito de desenvolver potenciais drogas antivirais (Saiz, Oya et al. 2018).

As drogas antivirais constituem uma abordagem promissora por ter como alvo uma estrutura conservada dos vírus (Bernatchez, Tran et al. 2020). Isso minimiza os problemas advindos com a variabilidade que geralmente as espécies virais apresentam. Focar em uma estrutura conservada, aumenta a possibilidade de que um antiviral seja eficiente contra todas as variações daquela espécie e com possibilidade de que seja também eficiente contra uma outra espécie de vírus da mesma família (Low, Ooi et al. 2017).

Neste trabalho foi realizada uma avaliação do potencial efeito antiviral de derivados 1,2,3 triazólicos da vanilina contra o ZIKV, buscando elucidar seu mecanismo de ação. A Vanilina é um produto secundário das plantas, encontrada em vários óleos essenciais, alimentos processados, bebidas e inúmeros produtos farmacêuticos com relatos na literatura dos seus efeitos antitumorais, antimetastáticos, antimicrobiano, antifúngico, anti-inflamatório e antioxidante (Bezerra, Soares et al. 2016). Tendo em vista que a vanilina possui uma similaridade estrutural com o eugenol, e que estudos recentes demonstraram ação antiviral e leishmanicida de derivados triazólicos do eugenol (Teixeira, Gazolla et al. 2018, de Oliveira, Gazolla et al. 2019), o presente estudo portanto teve como interesse o variado espectro de atividade biológica de compostos derivados da vanilina contendo núcleos 1,2,3 triazólicos.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA

O vírus da Zika foi isolado primeiramente em 1947 pelo virologista escocês George WA Dick e sua equipe de trabalho no soro de um primata não humano conhecido como macaco rhesus sentinela que habitava a floresta do Zika em Uganda na África (Dick, Kitchen et al. 1952). Nesta mesma região o Zika Vírus foi isolado de uma espécie de mosquito do gênero *Aedes*, o *Aedes africanus* e de outras espécies de primatas (Musso and Gubler 2016). Desde então se disseminou rapidamente pelo território africano e também na Ásia com os primeiros relatos fora desta zona em 2007 na ilha de Yap e posteriormente se espalhando pelas ilhas do Pacífico em meados de 2013-2014, e nas Américas seus relatos se iniciam em 2015 onde favoravelmente vem se estabelecendo (White, Wollebo et al. 2016). O vírus da Zika circulou a África e Ásia por pelo menos meio século e devido sua relação estreita com outras arboviroses como os vírus da Dengue (DENV) e Febre Amarela (YFV), suas manifestações clínicas se apresentam de forma semelhante com sintomas que incluem febre leve, erupção cutânea, artrite, cefaleia e edema o que contribuiu para subnotificação dos casos relacionados ao Zika (Weaver, Charlier et al. 2018). O ZIKV possui um sorotipo e três linhagens principais, duas africanas se dividindo em Oriental e Ocidental se limitando a essas regiões e uma asiática com expansão geográfica (Kazmi, Ali et al. 2020).

O primeiro relato de infecção em humanos pelo Zika vírus foi em 1954 na Nigéria durante um surto de icterícia que se apresenta como um amarelamento da pele devido o acúmulo de bilirrubina no sangue. A relação da manifestação clínica de icterícia e infecção pelo Zika Vírus se deu pelo isolamento do vírus e presença de anticorpos neutralizantes em pessoas infectadas (Song, Yun et al. 2017). Entre as décadas de 50 e 80 os casos de populações humanas infectadas pelo Zika Vírus fora do território africano foram relatados na Ásia em diferentes países como Índia, Indonésia, Malásia e permaneceu nestes territórios com surtos esporádicos (Kuadkitkan, Wikan et al. 2020). Um surto significativo da doença do Zika ocorreu em 2007 na ilha de Yap no Oeste do Oceano Pacífico, em que cerca de 75% da população desta região foi estimada com infecção pelo Zika e a linhagem responsável identificada como asiática. A sintomatologia e os aspectos clínicos da doença foram relatados como leves caracterizadas por febre, erupção cutânea, artralgia e conjuntivite (Sharma, Sharma et al. 2020). Os casos antes esporádicos e restritos apenas às regiões africanas e asiáticas tomaram então proporções alarmantes, com surtos da febre do Zika relatados também na Polinésia Francesa em 2013-2014

e rapidamente se espalhou para outras ilhas do oceano pacifico como as Ilhas Cook, Ilha de Páscoa, Nova Caledônia e Ilhas Salomão (Kazmi, Ali et al. 2020). O surto da Polinésia Francesa culminou em cerca de 30.000 casos da doença, porém não se sabe ao certo o número de casos devido a infecções silenciosas, esse resultado se deu devido a imunidade quase que inexistente ao ZIKV e também ao aumento da densidade dos mosquitos vetores competentes (Sharma, Sharma et al. 2020). A sintomatologia e os aspectos clínicos observados nos infectados no surto da Polinésia Francesa se assemelham aos da Ilha Yap, porém um aumento incomum nos casos de complicações neurológicas e doenças auto imunes como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) foram suspeitos de estarem associados a doença do Zika. A prevalência foi em homens com idade média de 46 anos, representando 74% do número de casos (Aubry and Cao-Lormeau 2019). Diferentemente dos casos esporádicos presentes nas regiões da África e Ásia em que a transmissão local envolveu mosquitos concentrados nas florestas com ciclos de transmissão silvestre entre mosquitos e primatas não humanos e em pequenas proporções entre mosquitos e humanos os casos dos surtos da Ilha de Yap em 2007 e da Polinésia Francesa em 2013-2014 envolveram mosquitos *Aedes aegypti*, *A. albopictus*, *A. hensilli* e *A. polynesiensis* concentrados em áreas mais urbanas e suburbanas (MacDonald and Holden 2018).

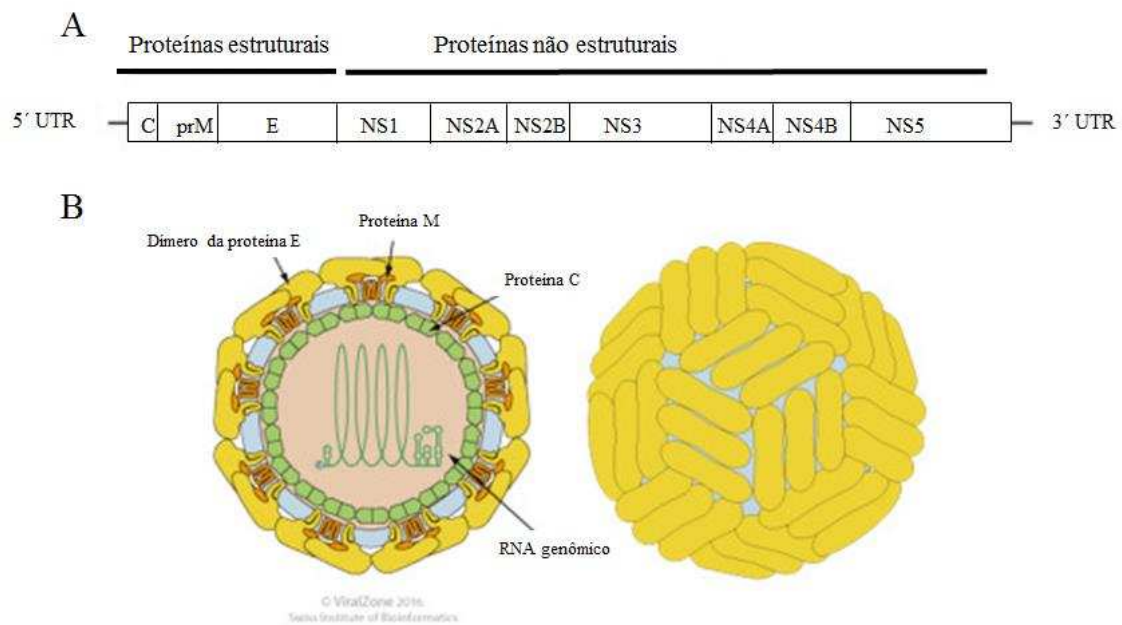
Em 2014 cerca de 50 casos confirmados da febre do Zika foram registrados no Chile, as evidências sugerem que o ZIKV foi trazido para a Ilha de Páscoa por viajantes vindos da Polinésia Francesa (Sharma, Sharma et al. 2020). O vírus portanto se estabeleceu nas Américas em 2013 e foi no início de 2015 que um surto significativo foi relatado no Brasil, inicialmente no Rio Grande do Norte e posteriormente na Bahia e até dezembro de 2015 cerca de 18 estados brasileiros continham relatos de transmissão autóctone e estima se cerca de 440.000-1.300.000 casos suspeitos (Lowe, Barcellos et al. 2018). Curiosamente nas regiões de maior prevalência de infecções pelo ZIKV os casos de microcefalia aumentaram drasticamente e um número de aproximadamente 4000 casos e 46 óbitos já haviam sido notificados em unidades de saúde pelo país com 35% do total presentes em Pernambuco (Paixao, Barreto et al. 2016). Após estas evidências, estudos retrospectivos nos surtos da Polinésia Francesa chegaram à conclusão de que os casos de malformação congênita e microcefalia em fetos foram aumentados naqueles anos (Aubry and Cao-Lormeau 2019). Desde sua introdução nas Américas marcado pelo alarmante número de casos confirmados no Brasil, a distribuição rápida nas Américas central e do sul e as evidências da infecção pelo Zika vírus com malformações congênitas nos fetos levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar em fevereiro de 2016 “ uma emergência de saúde pública internacional” (Song, Yun et al. 2017). Nos Estados Unidos os primeiros casos

ocorreram em 2016 na Flórida e no Texas tomando conta destes territórios em que cerca de ~2000 gestantes foram diagnosticadas com infecção pelo Zika vírus e grande parte dos recém nascidos apresentaram defeitos congênitos como: Microcefalia, depósitos de cálcio no cérebro ocasionando danos cerebrais, estruturas cerebrais ausentes ou com má formação (Hills, Fischer et al. 2017, Sharma, Sharma et al. 2020).

As inúmeras infecções pelo ZIKV vêm cada vez mais aumentando nas Américas em que os principais vetores envolvidos são o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* com distribuição geográfica extensa devido às favoráveis condições ambientais e a significativa adaptação aos centros urbanos (MacDonald and Holden 2018). Além da transmissão vetorial, outras rotas de transmissão como pelo contato sexual ou transfusão sanguínea contribuem para o aumento dos casos de infecção (Kazmi, Ali et al. 2020). Recentemente pesquisadores identificaram uma cepa africana circulando no Brasil desde o fim de 2019 preocupando órgãos de monitoramento uma vez que a maior predominância de circulação são as cepas Asiáticas nas Américas, esta nova cepa portanto pode provocar novos surtos (Kasprzykowski, Fukutani et al. 2020).

## **2.2 VIROLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS ZIKA**

O Vírus da Zika é um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) pertencente à família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*. A partícula viral tem cerca de 40-60 nanômetros de diâmetro de simetria icosaédrica e envelopado com projeções na superfície (Sharma, Sharma et al. 2020). É um vírus cujo o genoma é composto por, um RNA de sentido positivo de aproximadamente 10.8 kilobases, que compreende três genes estruturais (Capsídeo (C), Membrana (M) e a do envelope (E)) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) com uma região flanqueadora não traduzida 5' e 3' (Figura 1) (Sirohi and Kuhn 2017).



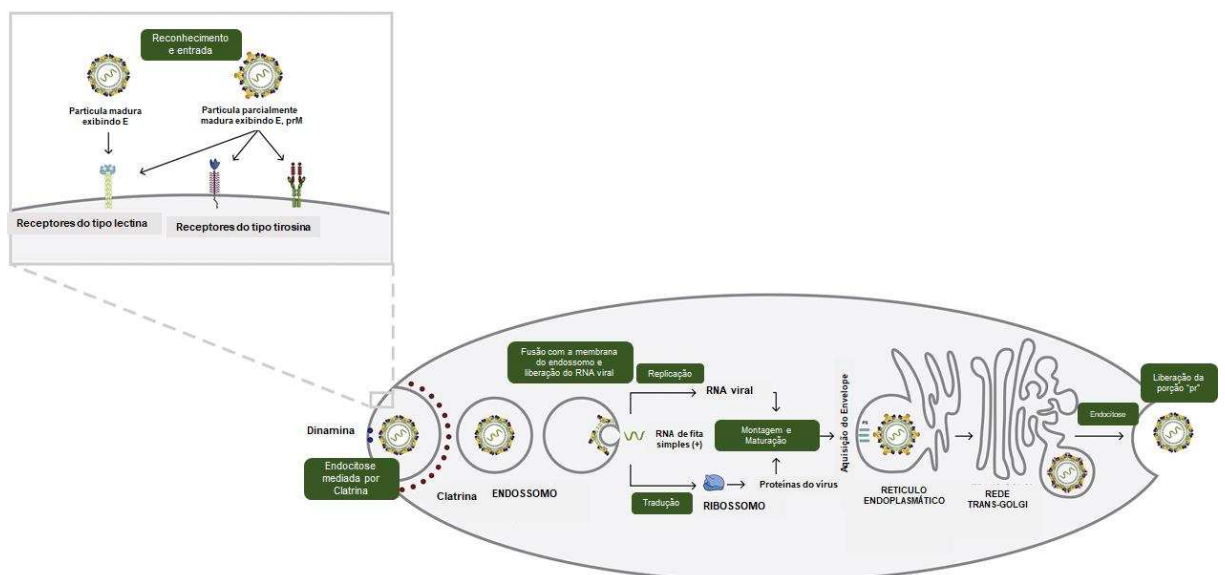
**Figura 1:** Adaptado de (Lin, Yip et al. 2018). Modelo esquemático da estrutura molecular do vírus da Zika. (A) RNA viral composto por um único quadro de leitura aberto contendo três genes que codificam três proteínas estruturais e sete genes que codificam sete proteínas não estruturais, flanqueado por duas regiões não traduzidas (UTR). (B) Estrutura dos vírions de Zika vírus, medindo em torno de 50 nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, envelopado, contendo as proteínas E e M com projeções na superfície, cobrindo o ribonucleocapsídeo formado pela proteína C e o RNA viral.

Seu genoma é traduzido em uma única poliproteína que posteriormente é clivado em 10 proteínas, em que três participam da estrutura do vírion, compreendendo a proteína do capsídeo C envolvida na encapsidação do RNA genômico formando uma estrutura denominada nucleocapsídeo (Lin, Yip et al. 2018). A proteína da membrana M que permanece ancorada a membrana lipídica proveniente da célula do hospedeiro cobrindo o capsídeo viral com função principal para maturação da partícula viral (Liu, Qu et al. 2018). E também ancorado à membrana lipídica a proteína E do envelope, principal envolvida no reconhecimento e ligação ao receptor celular, bem como na fusão das membranas viral e endossomal, considerada também como o principal determinante para o patogênese viral e direcionamento de anticorpos neutralizantes (Fontes-Garfias, Shan et al. 2017).

As sete proteínas não estruturais ( NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) estão envolvidas na formação do complexo de replicação, montagem da partícula viral e na evasão das respostas imunológicas do hospedeiro (Golubeva, Nepomuceno et al. 2020). A proteína NS1 faz parte do complexo replicativo, atua também na montagem do virion e pode ser

secretada, interagindo com fatores do hospedeiro moldando a patogênese viral e escape das respostas imunológicas (Wang, Thurmond et al. 2017). As proteínas NS2A e NS4B também estão envolvidas na replicação e no escape das respostas imunológicas, porém suas funções precisam ser melhor elucidadas. Já as proteínas NS2B e NS4A são cofatores importantes para o papel da proteína NS3 de protease e helicase. Atuando como RNA polimerase dependente de RNA a proteína NS5 é a maior proteína traduzida e a mais conservada, modificando e produzindo novas cópias de RNA viral (Hasan, Sevvana et al. 2018).

Assim como outros membros da família *Flaviviridae*, o vírus da Zika promove infecção e entrada nas células do hospedeiro através de endocitose mediada por clatrina (Figura 2) (Agrelli, de Moura et al. 2019). A proteína do envelope E reconhece receptores presentes na membrana plasmática das células do hospedeiro que pertencem predominantemente a três famílias de receptores principais, as do tipo lectina, mucina de imunoglobulina de células T e os receptores tirosina quinase (Ojha, Rodriguez et al. 2018, Agrelli, de Moura et al. 2019). A proteína E é composta por três domínios (Sirohi, Chen et al. 2016). O domínio I (DI) é não contínuo e tem formato folha  $\beta$ , é responsável por formar uma ponte de ligação entre os domínios II e III e tem importante função nas mudanças conformacionais na proteína E durante a infecção. O domínio II (DII) é do tipo dedo não contínuo, seus resíduos promovem interações eletrostáticas e hidrofóbicas que atuam na estabilização dos dímeros da proteína E, é o local que se encontra o peptídeo de fusão, essencial para o processo de fusão da membrana viral e endossomal. O domínio III (DIII), do tipo imunoglobulina é o principal determinante antigênico pela sua interação primária com a célula do hospedeiro (Sirohi, Chen et al. 2016, Valente and Moraes 2019).



**Figura 2:** (Adaptado de Agrelli, de Moura et al. 2019)

O virion do Zika Vírus (ZIKV) é altamente coberto por homodímeros da proteína E que quando em contato com a célula aumenta sua infectividade pela interação com fatores de ligação até encontrar seus receptores de entrada (Smit, Moesker et al. 2011, Agrelli, de Moura et al. 2019). Os fatores de ligação encontrados nas células do hospedeiro são principalmente glicosaminoglicanos (GAGs) carregados negativamente como por exemplo os sulfatos de heparina e condroitina. Após interação com os receptores de ligação a proteína E é direcionada até encontrar um ou mais receptores de entrada (Smit, Moesker et al. 2011). A entrada dos virions de ZIKV é mediada pela interação de N-glicanos conjugados com a proteína E com os receptores de superfície celular do hospedeiro (Routhu and Byrareddy 2017). A proteína E do ZIKV após o processo de tradução passa por N-glicosilações em motivos de glicosilação altamente conservados nos aminoácidos asparagina, treonina e qualquer outro que interaja com a prolina nas posições 154 e 156 e portanto essa modificação tem um papel biológico importante para o ZIKV (Fontes-Garfias, Shan et al. 2017, Mossenta, Marchese et al. 2017).

Após a formação do complexo virions de ZIKV, fatores de ligação e receptores, este deve ser direcionado para o pontos específicos da membrana plasmática onde são encontrada proteínas que irão promover a internalização do ZIKV para o meio intracelular (Perera-Lecoin, Meertens et al. 2013, Carro and Cherry 2020). A endocitose portanto é mediada pelas proteínas clatrina que estão naturalmente envolvidas com a captação de moléculas, macromoléculas e nutrientes para o meio intracelular, promovendo a invaginação da membrana plasmática, que posteriormente é excisada pela proteína dinamina para então formação da vesícula coberta por clatrina (Carro and Cherry 2020). A maioria dos vírus usam esse mesmo processo para entrada nas suas células hospedeiras, bem como os vírus da família *Flaviviridae* que inclui o ZIKV. Após a formação da vesícula coberta por clatrina contendo virions de ZIKV, as clatrina são liberadas e a vesícula é direcionada para os endossomos precoces que subsequentemente sofrerá uma maturação em endossomos tardios possibilitando a fusão das membranas viral e endossomal e liberação do RNA viral no citoplasma (Sanchez-San Martin, Liu et al. 2009). O baixo pH dos endossomos é essencial para indução de alteração conformacional da proteína E que leva a exposição do loop de fusão necessário para a fusão da membrana endossomal e viral e liberação do RNA do vírus no citosol (Kaufmann and Rossmann 2011). É relatado que quando em contato com o pH ácido dos endossomos, motivos de aminoácido atuam como sensores de

pH e desestabilizam o complexo DI-DIII (Smit, Moesker et al. 2011). Inicialmente a proteína E sofre uma protusão na superfície viral pela dissociação dos homodímeros em monômeros expondo DII e conseqüentemente as alças do peptídeo de fusão que serão inseridas no folheto externo da membrana. Subseqüentemente ocorrerá a interação de três proteínas E que formarão um trímero instável estabilizado pela interação do DI das três proteínas. Em seguida acredita-se que o DIII se dobre sobre o trímero formando uma estrutura do tipo grampo, essas alterações induzem a fusão das membranas e formação de um poro de fusão e subseqüente liberação do nucleocapsídeo no citosol (Agreli, de Moura et al. 2019).

O RNA viral assim que liberado no citosol é imediatamente reconhecido como RNA mensageiro e o processo de tradução é iniciado levando a formação da poliproteína (Aktepe and Mackenzie 2018). A parte N-terminal da proteína nascente possui um sinal de localização no retículo endoplasmático (RE) rapidamente reconhecido por ribossomos associados ao RE. O RE é portanto uma plataforma de membrana essencial para continuidade do processamento da poliproteína e a formação dos complexos de replicação (Sager, Gabaglio et al. 2018).

Três estruturas de membranas diferentes são visualizados pela mudança da arquitetura do RE em infecções por membros da família Flaviviridae (Apte-Sengupta, Sirohi et al. 2014). As membranas do RE se diferenciam em sacos membranosos ou pacotes de vesículas (Vp) que são pequenos aglomerados de vesículas de membrana (Ve), local onde o complexo de replicação é formado, e membranas convultas (MC) onde acredita-se que o RNA viral é traduzido e dá-se início ao processamento da poliproteína (Apte-Sengupta, Sirohi et al. 2014, Aktepe and Mackenzie 2018). Uma série de fatores do hospedeiro e virais trabalham para remodelação do RE e formação das membranas de replicação e tradução/processamento, induzindo mudanças na composição lipídica e proteica (Diosa-Toro, Prasanth et al. 2020). As proteínas virais NS4A e NS4B estão envolvidas nesta remodelação, bem como o recrutamento da proteína celular reticulon 3.1A diretamente envolvida na manutenção da estrutura do RE (Aktepe and Mackenzie 2018, Ojha, Rodriguez et al. 2018).

Após a formação das vesículas de membrana o complexo de replicação é formado, onde o RNA viral, a helicase NS3 e a polimerase NS5 se associarão ao lado citoplasmático da membrana formada e o emprego de lipídeos é promovido pela associação das proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B, e o complexo é estabilizado no lado luminal do RE pelos dímeros da proteína NS1 e suas interações com NS4A e NS4B (Apte-Sengupta, Sirohi et al. 2014). O RNA recém sintetizado é capturado pela proteína C do capsídeo formando o nucleocapsídeo para

posterior montagem pela associação com as glicoproteínas virais produzidas nas membranas convultas seguido pela maturação da partícula viral no Golgi (Barnard, Abram et al. 2021).

Ainda nas membranas no RE as partículas virais de ZIKV são montados e direcionados ao Golgi através da via secretora (Sager, Gabaglio et al. 2018). A proteína C é localizada no lado citoplasmático do RE e as glicoproteínas de membrana PrM e E no lado luminal, onde também passam por modificações pós traducionais pela ação das chaperonas celulares calreticulina, calnexina e GRP78 promovendo o dobramento correto destas (Limjindaporn, Wongwiwat et al. 2009, Lewy, Grabowski et al. 2017). Os locais de montagem estão em uma posição justa-posta próximo às vesículas de replicação, uma vez que não foi identificado sinal de empacotamento no RNA viral e aparentemente a interação da proteína C e o RNA viral recém sintetizado não é específico, portanto essa posição é essencial para especificidade de incorporação do RNA viral em partículas virais que devem seguidamente brotar no lúmen do reticulo endoplasmático (Cortese, Goellner et al. 2017, Liu, Kline et al. 2018).

As glicoproteínas virais PrM e E possuem um papel crucial na secreção de virions membros da família Flaviviridae por possuírem o sinal responsável pela interação da partícula viral com a maquinaria secretora celular (Sager, Gabaglio et al. 2018). Acredita-se que o brotamento na membrana do reticulo endoplasmático é dirigido pelo revestimento com proteínas formando vesículas denominadas de COPII que naturalmente direcionam cargas do RE para o Golgi. Vesículas revestidas por COPII possuem um tamanho de ~ 60 a 100 nm e portanto se limitaria a transportar apenas um virion imaturo cujo o tamanho é ~ 50 nm, este problema é resolvido pela associação dos aglomerados de partículas virais com diferentes tipos de receptores de cargas o que leva ao aumento da área de revestimento de COPII e a formação de vesículas maiores (Burlaud-Gaillard, Sellin et al. 2014, Sager, Gabaglio et al. 2018).

As partículas de Zikv imaturos necessitam da passagem pelo Golgi para então serem liberados pelas vias de exocitose como partículas virais maduras (Sirohi and Kuhn 2017). Portanto as proteínas residentes no Golgi como a furina, a adição de açúcares nas glicoproteínas virais e o baixo pH presente na estrutura trans-Golgi são essenciais para maturação dos virions de ZIKV (Sager, Gabaglio et al. 2018). Ao sair do reticulo endoplasmático a partícula viral imatura de Zikv possui uma superfície pontiaguda composta por 180 heterodímeros de PrM e E associados em 60 projeções triméricas. O baixo pH da cisterna trans do Golgi no processo de maturação da partícula viral induz a reorganização da projeção trímica para 90 dímeros, expondo o sitio de clivagem de PrM. A proteína furina atua como protease e cliva “Pr” que

permanece associado à partícula viral até o brotamento da célula hospedeira se desassociando devido ao pH neutro do meio extracelular (Sirohi and Kuhn 2017, Agrelli, de Moura et al. 2019)

A liberação das partículas virais para o meio extracelular ainda não é bem compreendido quanto os processos anteriores que culminam na formação da partícula viral, portanto sabe-se que o brotamento depende de compartimentos membranosos (Chen, Bagchi et al. 2020). Estudos suportam hipóteses de que o brotamento envolve a compartimentalização de grupos de virions em grandes vesículas bem como partículas individuais em vesículas pequenas que se fundem com a membrana plasmática das células e que essa entrega não é dependente de clatrina (Sager, Gabaglio et al. 2018). É desconhecido a natureza dos transportadores que entregam os virions a membrana plasmática, porém estudos com o vírus da Dengue indicam que a liberação das partículas virais estão associadas ao complexo EXOCYST, que em células não infectadas está envolvido na vias dos portadores de secreção na membrana plasmática (Chen, Lin et al. 2011). Quando essa maquinaria multiproteica é destruída a redução da secreção de virions é drasticamente reduzida. Evidências da atuação do complexo EXOCYST na secreção de virions do Zika ainda são escassas, porém deve ser levado em consideração. Em células de inseto a eficiência da secreção de virions de Zika é superior a de células de mamífero, suportando o princípio de que os *Flavivirus* evoluíram de patógenos de inseto, os diferentes tipos de células eucarióticas também implicam em diferentes eficiências de secreção (Sager, Gabaglio et al. 2018).

## **2.3 TRANSMISSÃO**

Componente do grupo dos arbovírus o Zika vírus pode ser também transmitido por vias secundárias como sexual, transfusional ou vertical (materno-fetal) (Masmajan, Musso et al. 2020).

### **2.3.1 TRANSMISSÃO PELA PICADA DE MOSQUITOS COMPETENTES**

O principal modo de transmissão do ZIKV é através da picada de mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Aedes* (Sharma and Lal 2017). Na África a espécie *Aedes africanus* é o

principal responsável pelo ciclo de transmissão silvestre ocorrendo de mosquito para primatas não humanos sendo que a extensão desse ciclo para transmissão viral em humanos não foi muito bem caracterizada, devido à falta de vigilância e monitoramento nestes locais e devido aos surtos esporádicos e à concentração desses mosquitos em áreas de florestas (Mamejan, Musso et al. 2020). As espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* estão associados à grande maioria das transmissões urbanas e se concentram em regiões tropicais e subtropicais e o *albopictus* se expandindo para regiões temperadas (Sharma and Lal 2017). Nas Américas as prevalências de infecção pela picada de mosquito se devem as espécies *A.aegypti* e *A.albopictus* porém outras espécies também são capazes de promover a infecção através da picada como é o caso da espécie *Aedes hensilli* responsável pelo surto na ilha de Yap e o *A.polynesiensis* responsável pelo surto da Polinésia Francesa (Tham, Balasubramaniam et al. 2018). Os mosquitos infectados com arbovírus permanecem infectados por toda a vida e são locais favoráveis para manutenção das arboviroses por permitirem sua rápida replicação do intestino médio a hemolinfa, no corpo adiposo, músculos, tecido neural e glândulas salivares (Tham, Balasubramaniam et al. 2018, Mamejan, Musso et al. 2020).

Cerca de 25 espécies de mosquito tem sido relatados quanto sua competência na transmissão do ZIKV, a maioria compreende os do gênero *Aedes*, seguido pelos gêneros *Culex* e *Anopheles* em que em condições de laboratório o ZIKV foi isolado de suas glândulas salivares (Gregory, Oduyebo et al. 2017). Há muitas controvérsias da suposta competência da espécie *Culex quinquefasciatus* alguns estudos relatam que esta espécie possui um potencial de transmissão do ZIKV, porém as amostragens não são significativas e portanto até o presente momento as espécies de *Culex* não desempenham um papel importante para transmissão do ZIKV (Gutierrez-Bugallo, Piedra et al. 2019).

Após a picada dos mosquitos infectados, as células endoteliais e dendríticas são os primeiros alvos para propagação do ZIKV que posteriormente se dissemina entre os vasos sanguíneos rompendo a barreira sangue-tecido atingindo o útero, testículos e cérebro (Khaiboullina, Ribeiro et al. 2019).

### **2.3.2 TRANSMISSÃO SEXUAL**

Dentre os arbovírus, o vírus da Zika é aparentemente o único que está associado à transmissão por vias sexuais (Sherley and Ong 2018). O primeiro relato de transmissão sexual

pelo vírus da Zika ocorreu em 2008 quando um cientista norte americano que havia viajado para uma área endêmica retornou com sintomas característicos da doença do Zika e manteve relações sexuais desprotegidas com sua esposa que não estava presente em áreas endêmicas ou em regiões que haviam relatos da presença de mosquitos competentes e quatro dias após apresentou sintomas semelhantes (Foy, Kobylinski et al. 2011). Desde então o aumento do número de casos de uma possível infecção através das vias sexuais tornou-se concreta com a identificação de RNA viral e vírus infeccioso em amostras de sêmen e fluidos vaginais (Masmejan, Musso et al. 2020).

Transmissões de homem-homem, homem-mulher e mulher-homem foram relatadas e notavelmente a transmissão mais comum é de homem para mulher compreendendo cerca de 92% dos casos, seguidos de homem-homem e mulher para homem. A principal forma de transmissão sexual é a vaginal desprotegida (96%) seguidos pela oral (18,5%) e anal (7,4%), na maioria dos casos a transmissão se deu por pessoas sintomáticas porém há relatos de pessoas assintomáticas possivelmente que infectaram seus parceiros (Moreira, Peixoto et al. 2017, Khaiboullina, Ribeiro et al. 2019).

A persistência do ZIKV no trato genital masculino parece ser constante, com a identificação de RNA viral no sêmen por vários meses porém o vírus infeccioso parece estar presente apenas na fase aguda podendo alterar a qualidade dos espermatozoides diminuindo o número de espermatozoides viáveis (Masmejan, Musso et al. 2020). Uma vez que o testículo é um órgão imunoprivilegiado devido a proteção da barreira hemato-testicular a capacidade de disseminação e persistência do ZIKV nessas regiões são preocupantes e associadas a infertilidade masculina (Payne, Kenny et al. 2020). Em relação ao trato reprodutivo feminino a presença do ZIKV nas secreções vaginais é rara e não persistente (Masmejan, Musso et al. 2020, Payne, Kenny et al. 2020).

Órgãos como o Centro de Controle de Prevenção de Doenças nos Estados Unidos e a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendam que homens sintomáticos ou assintomáticos compatíveis com o ZIKV mantenham relação sexual protegida com seus parceiros por até 6 meses e que mulheres esperem pelo menos até 8 semanas (Petersen, Meaney-Delman et al. 2016, 2020).

### **2.3.3 TRANSMISSÃO SECUNDÁRIA ( MATERNO-FETAL E POR TRANSFUSÃO SANGUÍNEA)**

Fetos natimortos de mães que foram expostas ao vírus da Zika e apresentaram malformações congênitas graves contribuíram para suportar o fato da transmissão vertical de mãe para filho (Collins and Waggoner 2019). A placenta é uma barreira que tende a proteger o feto de microrganismos patogênicos presentes no organismo da gestante, entretanto nem sempre essa proteção é eficaz e os patógenos, como no caso do ZIKV, podem atravessar essa barreira e se disseminarem no tecido nervoso fetal (Zanluca, de Noronha et al. 2018). Dados indicam que a transmissão vertical ocorra entre 20 a 30% de gestantes expostas ao ZIKV, e o primeiro trimestre da gravidez o de maior risco para evolução de um quadro clínico de neuropatologia fetal (Masmajan, Musso et al. 2020). A transmissão uterina trouxe preocupações globais, principalmente em locais endêmicos de infecção pelo ZIKV como é o caso do Brasil em que o número de fetos diagnosticados com microcefalia está aumentando e na grande maioria dos casos há uma relação direta com infecção pelo Zika vírus (Sharma and Lal 2017). Vale ressaltar que a detecção de RNA viral mas não de vírus infeccioso foi relatado no leite materno, portanto um novo mecanismo de transmissão de mãe para filho pode ser introduzido e carece de investigação (Zanluca, de Noronha et al. 2018).

A transmissão do ZIKV através de sangue infectado de doadores por transfusão sanguínea é ínfimo, compreendendo cerca de 1% dos casos. Ainda assim a preocupação quanto esse modo de transmissão deve ser mantida e órgãos competentes como a OMS sugerem testagem em todos os bancos de sangue e doadores para diminuir o risco de infecção (Masmajan, Musso et al. 2020).

### **2.4 NEUROPATOLOGIAS ASSOCIADAS AO ZIKV**

O vírus da Zika foi considerado recentemente um agente neurotrópico devido às características concretas de sua associação com anomalias cerebrais (Vhp, Aragao et al. 2020). Historicamente as manifestações clínicas observadas em pacientes sintomáticos infectados pelo vírus da Zika eram leves e autolimitada a uma doença febril semelhante a gripe com mialgias, artralgias, febre, dor de cabeça, erupção cutânea, conjuntivite e fadiga (Abrams, Solis et al.

2017). Porém os surtos recentes nas Américas indicam que as complicações advindas da infecção pelo ZIKV estão associadas a complicações neurológicas graves como encefalite, atrofia muscular, Síndrome de Guillain Barré e Microcefalia em neonatos (Blazquez and Saiz 2016). É demonstrado que o ZIKV infecta uma gama de células neurais *in vitro e in vivo* como células tronco neurais, astrócitos, células precursoras de oligodendrócitos e microglia entretanto sua preferência é por células neuroprogenitoras de fetos e adultos (Russo and Beltrao-Braga 2017, Acosta-Ampudia, Monsalve et al. 2018). A infecção dessas células neuroprogenitoras humanas pela cepa do ZIKV forneceram uma pista inicial para a neuropatologia ligada a microcefalia e outras anormalidades cerebrais do Sistema Nervoso Central (Olagnier, Muscolini et al. 2016).

#### **2.4.1 SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA E MICROCEFALIA**

A Síndrome Congênita do Zika (SCZ) é determinada por um quadro complexo de anomalias associadas à transmissão materno-fetal (Pomar, Musso et al. 2019). Características como microcefalia grave em que o crânio colapsou parcialmente, dano cerebral com diminuição do tecido cerebral, danos na parte posterior dos olhos como manchas na retina, contraturas congênicas como pé torto ou artrogripose e hipertonia marcada e, ou restrição do movimento corporal logo ao nascer, diferem a SCZ de outras infecções congênicas (Pomar, Musso et al. 2019, Vhp, Aragao et al. 2020).

A estreita relação entre a infecção pelo ZIKV e patologias durante a gravidez se deu durante o surto nas Américas do Sul e Central em que cerca de 58 casos de microcefalia fetal foram notificados em um único mês no nordeste do Brasil (Pardy and Richer 2019). A microcefalia foi considerada a primeira anomalia associada ao SCZ seguido de atrofia cerebral grave, ventriculomegalia e calcificação intracraniana (Liang, Guida et al. 2019).

A microcefalia é um defeito congênito grave em humanos descrito como uma condição clínica em que o tamanho da cabeça medido pela circunferência occipitofrontal é inferior a -3 desvios padrão menor que o normal para o sexo e idade em específico (Vhp, Aragao et al. 2020). O primeiro trimestre da gravidez é fundamental para o desenvolvimento neurológico e a infecção pelo ZIKV neste período tem maior probabilidade de afetar o sistema nervoso central dos fetos e este fato está intimamente relacionado à microcefalia associado à infecção pelo ZIKV (Faizan, Abdullah et al. 2016). Um dos possíveis mecanismos em que a infecção pelo

ZIKV está associado a microcefalia é devido à permissibilidade de macrófagos placentários e citotrofoblastos ao ZIKV sendo que os macrófagos são as principais células alvo de infecção na placenta(Olagnier, Muscolini et al. 2016). A placenta é o principal órgão responsável por nutrir e proteger o feto durante o desenvolvimento e por isso é o principal mediador da transmissão vertical pelo ZIKV de mães para o cérebro fetal (Faizan, Abdullah et al. 2016, Olagnier, Muscolini et al. 2016).

A microcefalia associada ao ZIKV levantou muitas dúvidas uma vez que a última relação constatada de infecção e associação à microcefalia foi há mais de 50 anos e tinha como agente etiológico o vírus responsável pela rubéola (Li, Saucedo-Cuevas et al. 2016). Entretanto, a presença confirmada do ZIKV em líquido amniótico e tecido cerebral fetal e as altas taxas de microcefalia fornece evidências mais que suficientes da infecção perinatal de ZIKV e o desenvolvimento de microcefalia (Morris, Barichello et al. 2018). Em setembro de 2015 e fevereiro de 2016, anos que foram marcados pelo surto de ZIKV no Brasil. Brasil et al, demonstraram que dentre 88 gestantes avaliadas quanto a presença de RNA viral e alterações fetais via ultrassom, 42 destas eram positivas para o ZIKV e o restante negativas e que houve uma diferença drástica e significativa na incidência de microcefalia em gestantes ZIKV positivas em relação às gestantes ZIKV negativas (Brasil, Pereira et al. 2016). Um estudo retrospectivo realizado na Polinésia Francesa indica um aumento no número de casos de microcefalia nos surtos de ZIKV entre 2013 e 2014, antes disso a incidência no número de bebês com microcefalia eram de 2 a cada 10.000 bebês e durante o surto este número aumentou com uma incidência 50 vezes maior em que a cada 10.000, 95 bebês foram diagnosticados com microcefalia (Cauchemez, Besnard et al. 2016). O Brasil foi considerado o país com maior incidência de casos de microcefalia associados ao surto de ZIKV e em janeiro de 2016 cerca de 10.000 casos suspeitos e 2366 confirmados foram notificados constando no Relatório Epidemiológico de Zika da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e na OMS que decretou uma emergência de saúde pública internacional em fevereiro de 2016 (Wen, Song et al. 2017).

Um modelo *in vitro* para estudo da microcefalia foi estabelecido. Células neuro progenitoras (CNP), organoides corticais, cérebro de camundongo e modelos de cérebro fetal humano quando cultivadas demonstraram susceptíveis a infecção pelo ZIKV que induziu inflamação, proliferação reduzida e morte celular (Li, Saucedo-Cuevas et al. 2016). As CNPs humanas derivadas de células pluripotentes induzidas forneceram as primeiras evidências de que neurônios humanos eram susceptíveis à infecção pelo ZIKV (Acosta-Ampudia, Monsalve

et al. 2018). Culturas organotípicas de tecido cerebral demonstraram que astrócitos, microglia e oligodendrócitos provenientes de córtex em desenvolvimento são significativamente infectados pelo ZIKV (Wen, Song et al. 2017). Esses organóides são modelos interessantes para o estudo de como a infecção pelo ZIKV impactam o desenvolvimento cerebral uma vez que constituem muitos tipos celulares diferentes que são essenciais para o desenvolvimento e função normal do cérebro (Li, Saucedo-Cuevas et al. 2016, Wen, Song et al. 2017).

Apesar da importância que os modelos *in vitro* possuem em estudar as consequências da infecção pelo ZIKV, os modelos *in vivo* são essenciais para se compreender os mecanismos pelos quais o ZIKV está associado à perturbação sistêmica e à microcefalia sendo que atualmente apenas camundongos imunocomprometidos desenvolvem a doença (Morris, Barichello et al. 2018). Camundongos fêmeas grávidas Swiss Jim Lambert (SJL), que apresentam defeitos imunológicos leves, quando infectadas com ZIKV levam a microcefalia em embriões com os neonatos exibindo malformação cortical, morte celular apoptótica e autofagia. Modelos de camundongos fêmeas grávidas sem sinalização do interferon tipo 1 e ou camundongos selvagens com sinalização do interferon tipo 1 bloqueado por anticorpo, após infecção pelo ZIKV seus neonatos apresentaram microcefalia fetal. Modelos de camundongos susceptíveis ao ZIKV mostram danos à placenta e transmissão de vírus para o feto (Li, Saucedo-Cuevas et al. 2016).

#### **2.4.2 SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ ASSOCIADA AO ZIKV**

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) pode ser definida como uma doença autoimune incomum, comprometendo os nervos periféricos, culminando em paralisia progressiva (Barbi, Coelho et al. 2018). Em sua maioria os casos de SGB estão associados a uma infecção por inúmeros microrganismos patogênicos como o vírus da Zika (Acosta-Ampudia, Monsalve et al. 2018). A infecção induz a produção de autoanticorpos direcionados aos gangliosídeos presentes nas membranas das células nervosas, causando sintomas respiratórios, gastrointestinais e comprometimento neurológico com os pacientes desenvolvendo uma paralisia neuromuscular seguida pela perda de sensibilidade e dor (Acosta-Ampudia, Monsalve et al. 2018, Barbi, Coelho et al. 2018). Os mecanismos do ZIKV nas manifestações clínicas da SGB não são muito bem compreendidas, porém algumas hipóteses estão relacionadas a estes eventos (Acosta-Ampudia, Monsalve et al. 2018). Lucchese et al., propõe que as proteínas do

ZIKV compartilham peptídeos com proteínas humanas e que esses peptídeos possuem potencial imunológico fazendo com que após a infecção pelo ZIKV ocorra uma reação cruzada com proteínas presentes no cérebro ou outras moléculas que podem contribuir para o desenvolvimento de neuropatias relacionadas ao ZIKV. E que no caso da SGB a reação cruzada ocorre entre componentes do ZIKV e os gangliosídeos da membrana neuronal (Lucchese and Kanduc 2016). Outro evento que poderia associar infecções pelo ZIKV com a SGB é o aumento dependente de anticorpos (ADE), uma vez que infecções anteriores com outros membros da família Flaviviridae como é o caso do vírus da Dengue, anticorpos anti-dengue circulantes se ligariam no ZIKV porém não teriam capacidade de neutralização entretanto facilitariam a entrada do ZIKV nas células (Mancera-Paez, Roman et al. 2018, Rodriguez, Rojas et al. 2018).

A associação das manifestações características do SGB e as infecções pelo ZIKV foram inicialmente relacionadas durante o surto de Zika em 2013 na Polinésia Francesa (Pardy and Richer 2019). Um estudo de caso controle em um hospital na Polinésia Francesa demonstrou que pacientes diagnosticados com SGB e ZIKV em sua maioria produziram anticorpos IgM contra o ZIKV (93%) em relação a pacientes sem doença febril do mesmo hospital e o ZIKV foi detectado em todos os pacientes de um grupo controle sem sintomas neurológicos evidenciando o ZIKV como um fator de risco para a SGB. A estimativa de casos de SGB tinha como média anual 3-8 casos, neste ano a incidência aumentou para 42 casos, e assim colocando de lado qualquer dúvida sobre a relação das infecções de ZIKV com o desenvolvimento de SGB (Cao-Lormeau, Blake et al. 2016).

Nos surtos das Américas do sul e central a relação SGB e ZIKV foi ainda mais evidente (Pardy and Richer 2019). Relatórios foram apresentados em muitos países como Brasil, Colômbia, Honduras, Nicarágua e México com os pacientes apresentando sintomas bem semelhantes aos da Polinésia Francesa (Brasil, Sequeira et al. 2016, Pardy and Richer 2019). Durante novembro de 2015 e janeiro de 2016 o Brasil registrou 1.708 casos da Síndrome de Guillain Barré, 46 casos foram registrados em El Salvador em um período de 2 meses, já na Venezuela foram 252 casos. Na Colômbia a média anual era de 242 casos que aumentaram significativamente durante o curto período de novembro de 2015 a março de 2016 com 320 casos de SGB (Parra, Lizarazo et al. 2016, Munoz, Parra et al. 2017).

Especula-se que o fato de neuropatias associadas ao ZIKV como é o caso da SGB estarem relacionadas aos surtos a partir da Polinésia Francesa até as Americas e não ao surto

das ilhas de Yap é provavelmente devido ao surgimento de um ancestral viral comum e mais neurovirulento do que o encontrado nas ilhas de Yap (Barbi, Coelho et al. 2018).

## **2.5 DIAGNÓSTICO E DETECÇÃO DO ZIKV**

A infecção pelo Zika desencadeia uma sintomatologia não específica e bem semelhante aos sintomas provenientes de infecções com outros membros da família Flaviviridae, como é o caso do vírus dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV) (Munoz-Jordan 2017). Portanto um diagnóstico laboratorial e rápido se faz necessário para medidas de controle e prevenção. A grande maioria dos infectados pelo Zika são assintomáticos, dificultando ainda mais o diagnóstico da doença e isso reflete na subnotificação de casos e na incidência de doenças neurológicas como é o caso de microcefalia em neonatos (Peters and Stevenson 2019). Vale ressaltar que dentre as arboviroses o Zika é o único documentado que pode ser transmitido pelas vias sexuais, o que aumenta a necessidade de detecção e diagnóstico em gestantes e pessoas que estão ou estiveram em áreas endêmicas (Munoz-Jordan 2017).

O diagnóstico de infecção pelo ZIKV é possível através da detecção do material genético viral em amostras de fluidos ou tecidos de pessoas infectadas através de testes de amplificação do material genético viral como é o caso da RT-PCR. Métodos sorológicos também são utilizados, incluindo os teste de imunoabsorção enzimática (ELISA), testes de neutralização por redução de placa (PRNT) e testes rápidos como os ensaios de fluxo lateral (Singh, Dhama et al. 2017).

O antígeno pode ser identificado através de imunohistoquímica de tecidos comprometidos pelo Zika e pode ser isolado em amostras de soro humano, sêmen ou urina e seu título definido através da inoculação destas amostras em culturas de células (Musso and Gubler 2016). A detecção molecular do Zika pode ser feita através da RT-PCR, uma vez que é um vírus de RNA antes da amplificação do material genético este deve ser convertido em uma molécula de DNA complementar pela ação de uma polimerase conhecida como Transcriptase Reversa (Peters and Stevenson 2019). Cerca de 80% das infecções pelo Zika são assintomáticas e a detecção transitória no sangue, urina e soro são possíveis, porém a detecção não é possível pela RT-PCR (Landry and St George 2017). Uma alternativa à detecção pela RT-PCR é a técnica recentemente desenvolvida para detecção rápida de Zika conhecida como Amplificação

Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) (Silva, Pardee et al. 2019). Mesmo com a ótima qualidade dos resultados fornecidos pela RT-PCR, a extensiva preparação das amostras, extração do material genético, a utilização de equipamentos caros e interpretação qualificada, limita o emprego desta técnica (Silva, Paiva et al. 2019). O LAMP é um método alternativo de detecção devido sua amplificação rápida, farta e simples, refletindo nas vantagens em relação aos testes de RT-PCR, que incluem rapidez, baixo custo, alta sensibilidade e especificidade (Estrela, Mendes et al. 2019, Silva, Paiva et al. 2019, Silva, Pardee et al. 2019).

Os imunodiagnósticos para o Zika também são métodos utilizados principalmente devido à grande porcentagem de indivíduos assintomáticos e ampla janela de tempo para detecção, porém devido a estreita relação com outras arboviroses como é o caso do vírus da dengue (DENV), a reatividade cruzada dificulta o emprego destas tecnologias (Munoz-Jordan 2017). Portanto, para confirmação conclusiva do diagnóstico de Zika em áreas endêmicas com co-circulação de DENV, ensaios de neutralização por redução de placa são indispensáveis (Landry and St George 2017).

## **2.6 TRATAMENTO**

Mesmo após 14 anos desde o primeiro surto de Zika fora da África e Ásia, na ilha de Yap e suas associações com doenças neurológicas reconhecidas após os surtos da Polinésia Francesa em 2013 e nas Américas em 2015, medidas para tratamento contra o Zika não estão disponíveis no mercado (Silva, Santos et al. 2020). Atualmente, pacientes infectados pelo Zika recebem apenas cuidados paliativos que inclui repouso e ingestão de líquido ou medicamentos para alívio dos sintomas e bem estar dos pacientes (da Silva, Oliveira Silva Martins et al. 2018). O controle dos mosquitos vetores é a principal estratégia para controle e disseminação do Zika, bem como de outros membros da família *Flaviviridae*, como é o caso do vírus da dengue (DENV) (Quanquin, Wang et al. 2017, da Silva, Oliveira Silva Martins et al. 2018). Entretanto, estratégias para o desenvolvimento de vacinas e drogas antivirais têm sido colocadas em prática, uma vez que são as principais abordagens para contenção e ou avanço de uma doença de etiologia viral (Silva, Santos et al. 2020).

### 2.6.1 VACINAS

As vacinas estão entre as abordagens terapêuticas mais promissoras e entre os principais produtos conquistados pelo avanço da ciência para eliminação e prevenção de doenças infecciosas (Mao and Chao 2020). O desenvolvimento e o licenciamento de uma vacina dependem de muitos fatores que incluem o tempo de fabricação que pode levar de 6 a 36 meses e os extensos testes de controle de qualidade. Para uma vacina ser liberada no mercado requer a demonstração da segurança e eficácia bem como da capacidade de fabricação consistente (Plotkin, Robinson et al. 2017, Mao and Chao 2020).

Apesar das taxas baixas de mortalidade a associação do Zika com doenças neurológicas como é o caso da SGB em adultos e a Síndrome Congênita do Zika em fetos, são fatores mais que justificáveis para a o desenvolvimento e licenciamento de uma vacina contra o Zika (Garg, Mehmetoglu-Gurbuz et al. 2018). Entretanto, uma vacina contra o Zika precisa obedecer algumas exigências, uma vez que o principal público alvo são mulheres em idade reprodutiva, incluindo gestantes (Saiz 2019). A segurança para mulheres e gestantes é uma prioridade para o desenvolvimento de uma vacina contra o Zika, vacinas licenciadas contra outros *Flavivirus* por exemplo são contra indicados nesse público a menos que os benefícios superem os riscos (Garg, Mehmetoglu-Gurbuz et al. 2018). Além da segurança a eficácia da vacina precisa ser alta pois uma das rotas de transmissão do Zika é através da mãe para o feto e portanto a vacina precisa garantir a proteção da gestante e do feto (Saiz 2019, Evans-Gilbert 2020). Uma dificuldade e preocupação no desenvolvimento de vacinas para o Zika é que como este vírus co-circula em áreas endêmicas a outros vírus da família *Flaviviridae*, uma vacina poderia gerar anticorpos com reatividade cruzada e culminar no aumento dependente de anticorpo (ADE) (Evans-Gilbert 2020).

Mesmo com todas as dificuldades e considerações existem pelo menos 9 candidatos a vacina contra o Zika sob avaliação clínica e 25 em desenvolvimento não clínico (Barrett 2018). A eficácia protetora de uma vacina está ligada à sua capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes. Atualmente quase todas as abordagens para produção de vacinas contra o Zika estão disponíveis e sob ensaios clínicos como é o caso das vacinas de vírus inativado e ou vivo atenuado, baseado em ácidos nucleico (DNA ou RNA), partículas semelhantes a vírus, subunidades proteicas e ou vírus recombinante (Pattnaik, Sahoo et al. 2020).

As vacinas baseadas em ácidos nucleicos utilizam a poderosa e competente maquinaria celular dos hospedeiros. O DNA sintético contendo a informação que codifica a proteína viral usa da maquinaria de transcrição e tradução celular para produção de inúmeras proteínas virais alvo antigênicas. Não são capazes de reverter e replicar e portanto é uma abordagem mais segura do que o uso de vírus vivo atenuado (Makhluf and Shresta 2018). Vacinas baseadas em sequências que codificam as proteínas PrM-E do Zika foram desenvolvidas. As vacinas produzidas pelo Instituto Nacional de Doenças Infecciosas/Centro de Pesquisas em Vacinas denominadas VCR5288 e VCR5283 mostraram-se promissoras na indução de anticorpos neutralizantes contra Zika em primatas não humanos como foi o caso dos macacos rhesus e em indivíduos adultos saudáveis (Gaudinski, Houser et al. 2018, Makhluf and Shresta 2018). Um outro candidato a vacina de DNA, denominado GLS-5700 produzida pela farmacêutica GeneOne Life Science também induziu resposta robusta em camundongos deficientes da sinalização do interferon e nos ensaios clínicos de fase I, induziram a produção de anticorpos que se ligaram em 100% no Zika porém apenas 60% foi considerado neutralizante (Muthumani, Griffin et al. 2016, Tebas, Roberts et al. 2017).

As vacinas de mRNA induzem a tradução direta das proteínas virais e anulam o risco de incorporação ao material genético das vacinas de DNA (Makhluf and Shresta 2018). Vacinas em que o mRNA induz produção de proteínas virais baseadas nas proteínas PrM-E estão sendo testadas em ensaio de fase clínica I, pela farmacêutica Moderna (Garg, Mehmetoglu-Gurbuz et al. 2018). Denominadas mRNA1325 e mRNA1895, estas vacinas mostraram induzir proteção com a Síndrome Congênita do Zika e proteção durante a gravidez em camundongos imunocompetentes e imunocomprometidos (Richner, Jagger et al. 2017, Jagger, Dowd et al. 2019).

As vacinas de vírus vivo atenuado também foram propostas para o ZIKV, baseado em duas estratégias principais: inserção de mutações de atenuação e produção de vírus quimérico com regiões de outros *Flavivírus* (Pattnaik, Sahoo et al. 2020). Algumas vacinas tiveram eficácia protetora eficiente em camundongos imunocomprometidos e imunocompetentes, bem como nas suas proles (Shan, Muruato et al. 2017). Entretanto, como o público alvo são gestantes e mulheres em idade reprodutiva, essa plataforma não é recomendada pois vírus vivo atenuado pode causar viremia e neurovirulência e a possibilidade de reversão e transmissão viral (Makhluf and Shresta 2018, Pattnaik, Sahoo et al. 2020).

As vacinas de vírus inativado, ao contrário das de vírus vivo atenuado, impede a reversão e replicação e portanto são indicadas para gestantes (Makhluף and Shresta 2018). Em alguns casos, vacinas baseadas em vírus inativado requer o emprego de adjuvantes e por isso deve-se ter cautela na administração dessas vacinas em gestantes (Garg, Mehmetoglu-Gurbuz et al. 2018). A ZIKV PIV é uma vacina atenuada que atualmente está em fase clínica I após a comprovação de sua eficácia em modelos de camundongos e primatas não humanos (Modjarrad, Lin et al. 2018). Esta vacina está sendo financiada pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas e pelo Centro Médico Beth Israel Deacones (Makhluף and Shresta 2018).

As plataformas de produção de Partícula Semelhante a Vírus (VLPS) e as de subunidade também demonstraram resposta protetora contra Zika (Saiz 2019). VLPs são seguras, e como as proteínas estão na sua forma nativa, sua imunogenicidade é significativa e mais robusta em relação às de subunidade (Pattnaik, Sahoo et al. 2020).

Ainda que as vacinas sejam o padrão ouro para prevenção das infecções virais, no caso de Zika suas limitações e exigências devido ao público alvo e a co-circulação com outros *Flavivirus*, abordagens mais rápidas são necessárias e a busca por antivirais é a solução para este desafio (Quanquin, Wang et al. 2017).

## 2.6.2 ANTIVIRAIS

A busca por antivirais contra o Zika vem se estabelecendo a cada ano, uma vez que o desenvolvimento de vacinas possuem muitos desafios a serem resolvidos a longo prazo (Bernatchez, Tran et al. 2020). Os antivirais podem ser direcionados a diferentes estágios do ciclo infeccioso viral que incluem basicamente os mecanismos de entrada, replicação do genoma, montagem e liberação viral (Wang, Zou et al. 2017).

Os antivirais podem ser classificados quanto ao seu modo de ação: Antivirais de ação direta, que são aqueles direcionados aos alvos virais, e antivirais direcionados ao hospedeiro, que são aqueles direcionados contra os alvos celulares (Baz and Boivin 2019).

Os possíveis compostos antivirais portanto podem impedir a interação vírus-receptor celular, atuando diretamente sobre o envelope viral, promovendo uma desestabilização ou impedindo a ação das proteínas de superfície do vírus, responsáveis pela ligação aos receptores

presente nas células do hospedeiro, bem como podem interagir diretamente com carboidratos e proteínas celulares, que funcionam como fatores e receptores de entrada inibindo a infectividade viral (Alves, Vielle et al. 2018).

Carneiro et al., demonstraram que o Galato de epigallocatequina (EGCG), molécula presente no chá verde inibe a infecção do Zika pela sua ação virucida sobre a partícula viral (Carneiro, Batista et al. 2016). A polimerase NS5 do Zika também é um alvo constante para produção de antivirais de ação direta (Wang, Thurmond et al. 2018). A NS5 possui um domínio RNA polimerase e um metiltransferase, sendo este último importante para facilitar a tradução da poliproteína e escape das defesas imune do hospedeiro, além de ter sido relatada como fator fundamental na função de polimerase da NS5 (Qadir, Riaz et al. 2018). O composto 7-deaza-2CMA reduziu a infecção do Zika pela ação direta com a polimerase, atuando como inibidor da polimerase in vitro e diminuindo a viremia e mortalidade de camundongos AG129 infectados com o Zika (Zmurko, Marques et al. 2016).

Outro ponto importante para inibição do ciclo infeccioso viral é o direcionamento de antivirais para os eventos de endocitose, fusão dependente de pH e desnudamento da partícula viral (Alves, Vielle et al. 2018). A cloroquina por exemplo, inibe a acidificação do endossomo e conseqüentemente impede a fusão do envelope viral do Zika com a membrana do endossomo e assim não ocorre o desnudamento e liberação do material genético viral, entretanto é necessário doses muito altas, o que pode acarretar em toxicidade e comprometimento dos órgãos vitais (Delvecchio, Higa et al. 2016).

As proteases virais como é o caso da NS2B-NS3 do Zika, responsável pelo processamento da poliproteína também tem sido proposto como alvo para ação de antivirais. Inibidores da protease têm sido relatados como é o caso dos flavonóides que inibem a protease do Zika significativamente in vitro (Lim, Nguyen et al. 2017, Alves, Vielle et al. 2018, Qadir, Riaz et al. 2018).

A inibição da montagem, liberação e tráfego celular contribuem para redução e inibição do ciclo infeccioso viral. A inibição do tráfego celular por exemplo tem conseqüências em muitos pontos do ciclo infeccioso como na replicação, entrada, montagem e liberação viral (Albulescu, Kovacikova et al. 2017, Alves, Vielle et al. 2018).

Fatores do hospedeiro que participam da progressão e manutenção do ciclo viral também são pontos importantes para ação das drogas antivirais, uma vez que diferente dos

componentes virais são menos sujeitos a evasão dos efeitos por mutações que aparecem no genoma de vírus de RNA (Mottin, Borba et al. 2018). A cloroquina e a salifenillhalamida são potenciais agentes antivirais que atuam no bloqueio da acidificação dos endossomos e inibem a infecção do Zika (Delvecchio, Higa et al. 2016, Kuivanen, Bepalov et al. 2017).

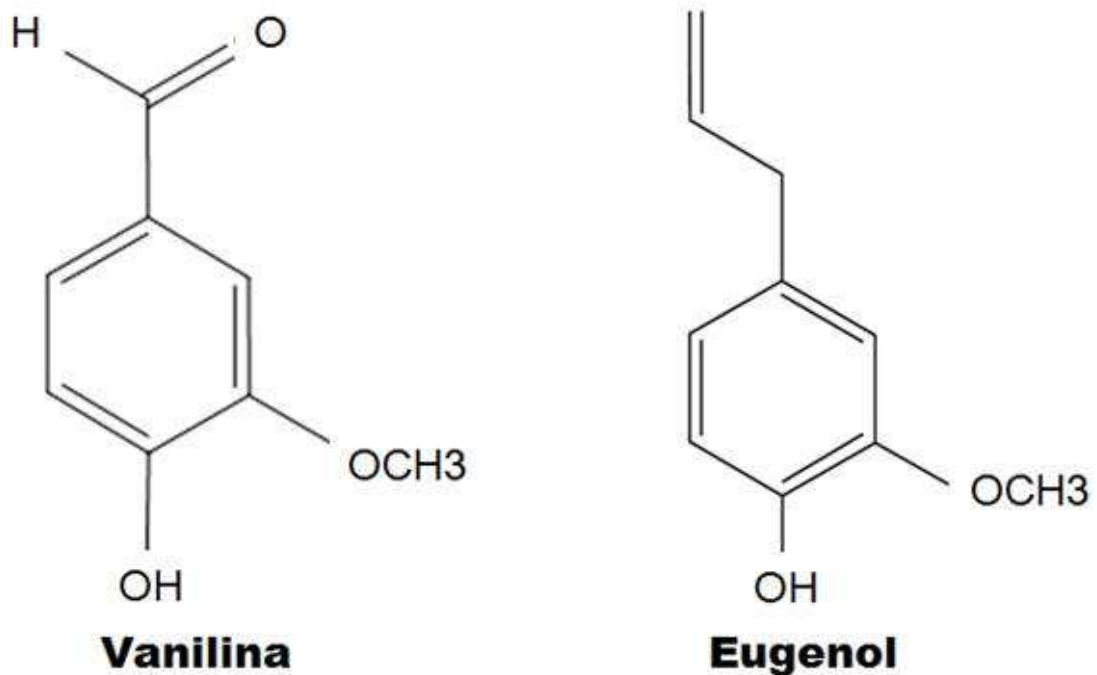
Atualmente a busca por antivirais contra o Zika têm se concentrado naqueles já pré aprovados pela “Food and Drug Administration (FDA)”, ou em moléculas já bem documentadas quanto seus efeitos antivirais para outras doenças (Gorshkov, Shiryaev et al. 2018). Moléculas como a niclosamida, ivermectina, daptomicina, mostraram efeitos contra o Zika in vitro (da Silva, Oliveira Silva Martins et al. 2018). A busca por compostos naturais, sintéticos e análogos de nucleosídeos que mostram eficácia na inibição do Zika in vitro e in vivo está em andamento desde os surtos de 2016 (Gorshkov, Shiryaev et al. 2018). Uma metodologia que está sendo aliada na busca por antivirais direcionados a componentes virais é o docking molecular, que simula os possíveis pontos de interação dos candidatos antivirais e seu possível alvo de ação. Poucos compostos atualmente estão sendo clinicamente testados, como é o caso do Sofobusvir, NITD008 e 7DMA (da Silva, Oliveira Silva Martins et al. 2018). Portanto a descoberta de novos potenciais antivirais contra o Zika e pesquisas adicionais são fundamentais para o controle da infecção e diminuição dos problemas advindos principalmente em gestantes de áreas endêmicas.

### **2.6.3 VANILINA E OS NÚCLEOS 1,2,3 TRIAZÓLICOS**

A Vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), é um composto aromático extraído das vagens de duas espécies de orquídeas, a *Vanilla planifolia* e *Vanilla tahitensis*, conhecido como o composto de sabor mais característico da Baunilha. É um aldeído aromático, caracterizado quimicamente como um composto fenólico simples. Pode ser obtida através do isolamento das vagens de baunilha, porém esse processo é dispendioso, e cerca de menos de 1% de vanilina é obtida de forma natural tendo sua maior produção concentrada em sua síntese em escala industrial usando por exemplo eugenol e lignina como fontes primárias (GALLAGE E MOLLER, 2015). Além do seu uso pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas devido às suas propriedades aromáticas, estudos têm demonstrado os mecanismos biológico da vanilina e seus benefícios para saúde com suas atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-metastáticas, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antifúngica, tornando o desenvolvimento de

compostos bioativos derivados da vanilina um ramo promissor contra inúmeras patologias ( PARK *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2019).

Os 1,2,3 triazóis pertencem a uma classe de heterociclos aromáticos que tem chamado a atenção da comunidade científica devido ao seu potencial biológico, estando presente em uma grande variedade de produtos naturais e medicinais. Seu núcleo possui uma estrutura química privilegiada e amplamente utilizada na síntese de fármacos para benefícios médicos (KERI *et al.*, 2015). Dentre os seus potenciais biológicos, destacam-se suas atividades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, anti-tuberculosos e anti-HIV (MOUSAZADEH *et al.*, 2017). Recentes estudos demonstraram que derivados do eugenol composto usado como fonte primária para produção em larga escala de vanilina, devido às suas similaridades químicas (Figura 3), funcionalizado com núcleos 1,2,3 triazólicos, obtiveram um efeito antiviral e leishmanicida significativo ( de OLIVEIRA *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2018).



**Figura 3:** Estrutura química da Vanilina e Eugenol ( Adaptado de Gallage e Moller, 2015; Barboza *et al.*, 2018)

### 3 REFERÊNCIAS

- Agrelli, A., R. R. de Moura, S. Crovella and L. A. C. Brandao (2019). "ZIKA virus entry mechanisms in human cells." Infect Genet Evol 69: 22-29.
- Aktepe, T. E. and J. M. Mackenzie (2018). "Shaping the flavivirus replication complex: It is curvaceous!" Cell Microbiol 20(8): e12884.
- Apte-Sengupta, S., D. Sirohi and R. J. Kuhn (2014). "Coupling of replication and assembly in flaviviruses." Curr Opin Virol 9: 134-142.
- Barnard, T. R., Q. H. Abram, Q. F. Lin, A. B. Wang and S. M. Sagan (2021). "Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly." Trends Biochem Sci.
- Burlaud-Gaillard, J., C. Sellin, S. Georgeault, R. Uzbekov, C. Lebos, J. M. Guillaume and P. Roingard (2014). "Correlative scanning-transmission electron microscopy reveals that a chimeric flavivirus is released as individual particles in secretory vesicles." PLoS One 9(3): e93573.
- Carro, S. D. and S. Cherry (2020). "Beyond the Surface: Endocytosis of Mosquito-Borne Flaviviruses." Viruses 13(1).
- Chen, Y. J., P. Bagchi and B. Tsai (2020). "ER functions are exploited by viruses to support distinct stages of their life cycle." Biochem Soc Trans 48(5): 2173-2184.
- Chen, Z., X. Lin, Z. Zhang, J. Huang, S. Fu and R. Huang (2011). "EXO70 protein influences dengue virus secretion." Microbes Infect 13(2): 143-150.
- Cortese, M., S. Goellner, E. G. Acosta, C. J. Neufeldt, O. Oleksiuk, M. Lampe, U. Haselmann, C. Funaya, N. Schieber, P. Ronchi, M. Schorb, P. Pruunsild, Y. Schwab, L. Chatel-Chaix, A. Ruggieri and R. Bartenschlager (2017). "Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories." Cell Rep 18(9): 2113-2123.
- Diosa-Toro, M., K. R. Prasanth, S. S. Bradrick and M. A. Garcia Blanco (2020). "Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle." Virology 17(1): 60.
- Fontes-Garfias, C. R., C. Shan, H. Luo, A. E. Muruato, D. B. A. Medeiros, E. Mays, X. Xie, J. Zou, C. M. Roundy, M. Wakamiya, S. L. Rossi, T. Wang, S. C. Weaver and P. Y. Shi (2017). "Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein." Cell Rep 21(5): 1180-1190.
- Golubeva, V. A., T. C. Nepomuceno, G. Gregoriis, R. D. Mesquita, X. Li, S. Dash, P. P. Garcez, G. Suarez-Kurtz, V. Izumi, J. Koomen, M. A. Carvalho and A. N. A. Monteiro (2020). "Network of Interactions between ZIKA Virus Non-Structural Proteins and Human Host Proteins." Cells 9(1).
- Hasan, S. S., M. Sevvana, R. J. Kuhn and M. G. Rossmann (2018). "Structural biology of Zika virus and other flaviviruses." Nat Struct Mol Biol 25(1): 13-20.
- Kaufmann, B. and M. G. Rossmann (2011). "Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry." Microbes Infect 13(1): 1-9.

- Lewy, T. G., J. M. Grabowski and M. E. Bloom (2017). "BiP: Master Regulator of the Unfolded Protein Response and Crucial Factor in Flavivirus Biology." Yale J Biol Med 90(2): 291-300.
- Limjindaporn, T., W. Wongwiwat, S. Noisakran, C. Srisawat, J. Netsawang, C. Puttikhunt, W. Kasinrerak, P. Avirutnan, S. Thiemmecca, R. Sriburi, N. Sittisombut, P. Malasit and P. T. Yenichitsomanus (2009). "Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production." Biochem Biophys Res Commun 379(2): 196-200.
- Lin, H. H., B. S. Yip, L. M. Huang and S. C. Wu (2018). "Zika virus structural biology and progress in vaccine development." Biotechnol Adv 36(1): 47-53.
- Liu, J., B. A. Kline, T. A. Kenny, D. R. Smith, V. Soloveva, B. Beitzel, S. Pang, S. Lockett, H. F. Hess, G. Palacios, J. H. Kuhn, M. G. Sun and X. Zeng (2018). "A novel sheet-like virus particle array is a hallmark of Zika virus infection." Emerg Microbes Infect 7(1): 69.
- Liu, X., L. Qu, X. Ye, C. Yi, X. Zheng, M. Hao, W. Su, Z. Yao, P. Chen, S. Zhang, Y. Feng, Q. Wang, Q. Yan, P. Li, H. Li, F. Li, W. Pan, X. Niu, R. Xu, L. Feng and L. Chen (2018). "Incorporation of NS1 and prM/M are important to confer effective protection of adenovirus-vectored Zika virus vaccine carrying E protein." NPJ Vaccines 3: 29.
- Mossenta, M., S. Marchese, M. Poggianella, J. L. Slon Campos and O. R. Burrone (2017). "Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity." Biochem Biophys Res Commun 492(4): 579-586.
- Ojha, C. R., M. Rodriguez, J. Lapierre, M. K. Muthu Karuppan, H. Branscome, F. Kashanchi and N. El-Hage (2018). "Complementary Mechanisms Potentially Involved in the Pathology of Zika Virus." Front Immunol 9: 2340.
- Perera-Lecoin, M., L. Meertens, X. Carnec and A. Amara (2013). "Flavivirus entry receptors: an update." Viruses 6(1): 69-88.
- Routhu, N. K. and S. N. Byrareddy (2017). "Host-Virus Interaction of ZIKA Virus in Modulating Disease Pathogenesis." J Neuroimmune Pharmacol 12(2): 219-232.
- Sager, G., S. Gabaglio, E. Sztul and G. A. Belov (2018). "Role of Host Cell Secretory Machinery in Zika Virus Life Cycle." Viruses 10(10).
- Sanchez-San Martin, C., C. Y. Liu and M. Kielian (2009). "Dealing with low pH: entry and exit of alphaviruses and flaviviruses." Trends Microbiol 17(11): 514-521.
- Sharma, V., M. Sharma, D. Dhull, Y. Sharma, S. Kaushik and S. Kaushik (2020). "Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide." Can J Microbiol 66(2): 87-98.
- Sirohi, D., Z. Chen, L. Sun, T. Klose, T. C. Pierson, M. G. Rossmann and R. J. Kuhn (2016). "The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus." Science 352(6284): 467-470.
- Sirohi, D. and R. J. Kuhn (2017). "Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors." J Infect Dis 216(suppl\_10): S935-S944.

- Smit, J. M., B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert and J. Wilschut (2011). "Flavivirus cell entry and membrane fusion." Viruses 3(2): 160-171.
- Valente, A. P. and A. H. Moraes (2019). "Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection?" J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 25: e20190013.
- Wang, A., S. Thurmond, L. Islas, K. Hui and R. Hai (2017). "Zika virus genome biology and molecular pathogenesis." Emerg Microbes Infect 6(3): e13.
- Aubry, M. and V. M. Cao-Lormeau (2019). "History of arthropod-borne virus infections in French Polynesia." New Microbes New Infect 29: 100513.
- Dick, G. W., S. F. Kitchen and A. J. Haddow (1952). "Zika virus. I. Isolations and serological specificity." Trans R Soc Trop Med Hyg 46(5): 509-520.
- Hills, S. L., M. Fischer and L. R. Petersen (2017). "Epidemiology of Zika Virus Infection." J Infect Dis 216(suppl\_10): S868-S874.
- Kasprzykowski, J. I., K. F. Fukutani, H. Fabio, E. R. Fukutani, L. C. Costa, B. B. Andrade and A. T. L. Queiroz (2020). "A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic?" Int J Infect Dis 96: 579-581.
- Kazmi, S. S., W. Ali, N. Bibi and F. Nouroz (2020). "A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics." J Biol Res (Thessalon) 27: 5.
- Kuadkitkan, A., N. Wikan, W. Sornjai and D. R. Smith (2020). "Zika virus and microcephaly in Southeast Asia: A cause for concern?" J Infect Public Health 13(1): 11-15.
- Lowe, R., C. Barcellos, P. Brasil, O. G. Cruz, N. A. Honorio, H. Kuper and M. S. Carvalho (2018). "The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications." Int J Environ Res Public Health 15(1).
- MacDonald, P. D. M. and E. W. Holden (2018). "Zika and Public Health: Understanding the Epidemiology and Information Environment." Pediatrics 141(Suppl 2): S137-S145.
- Musso, D. and D. J. Gubler (2016). "Zika Virus." Clin Microbiol Rev 29(3): 487-524.
- Paixao, E. S., F. Barreto, G. Teixeira Mda, C. Costa Mda and L. C. Rodrigues (2016). "History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review." Am J Public Health 106(4): 606-612.
- Sharma, V., M. Sharma, D. Dhull, Y. Sharma, S. Kaushik and S. Kaushik (2020). "Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide." Can J Microbiol 66(2): 87-98.
- Song, B. H., S. I. Yun, M. Woolley and Y. M. Lee (2017). "Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation." J Neuroimmunol 308: 50-64.
- Weaver, S. C., C. Charlier, N. Vasilakis and M. Lecuit (2018). "Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases." Annu Rev Med 69: 395-408.

White, M. K., H. S. Wollebo, J. David Beckham, K. L. Tyler and K. Khalili (2016). "Zika virus: An emergent neuropathological agent." Ann Neurol 80(4): 479-489.

(2020). WHO guidelines for the prevention of sexual transmission of Zika virus. Geneva.

Collins, M. H. and J. J. Waggoner (2019). "Detecting Vertical Zika Transmission: Emerging Diagnostic Approaches for an Emerged Flavivirus." ACS Infect Dis 5(7): 1055-1069.

Foy, B. D., K. C. Kobylinski, J. L. Chilson Foy, B. J. Blitvich, A. Travassos da Rosa, A. D. Haddow, R. S. Lanciotti and R. B. Tesh (2011). "Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA." Emerg Infect Dis 17(5): 880-882.

Gregory, C. J., T. Oduyebo, A. C. Brault, J. T. Brooks, K. W. Chung, S. Hills, M. J. Kuehnert, P. Mead, D. Meaney-Delman, I. Rabe, E. Staples and L. R. Petersen (2017). "Modes of Transmission of Zika Virus." J Infect Dis 216(suppl\_10): S875-S883.

Gutierrez-Bugallo, G., L. A. Piedra, M. Rodriguez, J. A. Bisset, R. Lourenco-de-Oliveira, S. C. Weaver, N. Vasilakis and A. Vega-Rua (2019). "Vector-borne transmission and evolution of Zika virus." Nat Ecol Evol 3(4): 561-569.

Khaiboullina, S. F., F. M. Ribeiro, T. Uppal, E. V. Martynova, A. A. Rizvanov and S. C. Verma (2019). "Zika Virus Transmission Through Blood Tissue Barriers." Front Microbiol 10: 1465.

Masmejan, S., D. Musso, M. Vouga, L. Pomar, P. Dashraath, M. Stojanov, A. Panchaud and D. Baud (2020). "Zika Virus." Pathogens 9(11).

Moreira, J., T. M. Peixoto, A. M. Siqueira and C. C. Lamas (2017). "Sexually acquired Zika virus: a systematic review." Clin Microbiol Infect 23(5): 296-305.

Payne, K., P. Kenny, J. M. Scovell, K. Khodamoradi and R. Ramasamy (2020). "Twenty-First Century Viral Pandemics: A Literature Review of Sexual Transmission and Fertility Implications in Men." Sex Med Rev 8(4): 518-530.

Petersen, E. E., D. Meaney-Delman, R. Neblett-Fanfair, F. Havers, T. Oduyebo, S. L. Hills, I. B. Rabe, A. Lambert, J. Abercrombie, S. W. Martin, C. V. Gould, N. Oussayef, K. N. Polen, M. J. Kuehnert, S. K. Pillai, L. R. Petersen, M. A. Honein, D. J. Jamieson and J. T. Brooks (2016). "Update: Interim Guidance for Preconception Counseling and Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus for Persons with Possible Zika Virus Exposure - United States, September 2016." MMWR Morb Mortal Wkly Rep 65(39): 1077-1081.

Sharma, A. and S. K. Lal (2017). "Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention." Front Microbiol 8: 110.

Sherley, M. and C. W. Ong (2018). "Sexual transmission of Zika virus: a literature review." Sex Health 15(3): 183-199.

Tham, H. W., V. Balasubramaniam, M. K. Ooi and M. F. Chew (2018). "Viral Determinants and Vector Competence of Zika Virus Transmission." Front Microbiol 9: 1040.

Zanluca, C., L. de Noronha and C. N. Duarte Dos Santos (2018). "Maternal-fetal transmission of the zika virus: An intriguing interplay." Tissue Barriers 6(1): e1402143.

Abrams, R. P. M., J. Solis and A. Nath (2017). "Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System." Neurotherapeutics 14(4): 1027-1048.

Acosta-Ampudia, Y., D. M. Monsalve, L. F. Castillo-Medina, Y. Rodriguez, Y. Pacheco, S. Halstead, H. J. Willison, J. M. Anaya and C. Ramirez-Santana (2018). "Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection." Front Mol Neurosci 11: 116.

Blazquez, A. B. and J. C. Saiz (2016). "Neurological manifestations of Zika virus infection." World J Virol 5(4): 135-143.

Brasil, P., J. P. Pereira, Jr., M. E. Moreira, R. M. Ribeiro Nogueira, L. Damasceno, M. Wakimoto, R. S. Rabello, S. G. Valderramos, U. A. Halai, T. S. Salles, A. A. Zin, D. Horovitz, P. Daltro, M. Boechat, C. Raja Gabaglia, P. Carvalho de Sequeira, J. H. Pilotto, R. Medialdea-Carrera, D. Cotrim da Cunha, L. M. Abreu de Carvalho, M. Pone, A. Machado Siqueira, G. A. Calvet, A. E. Rodrigues Baiao, E. S. Neves, P. R. Nassar de Carvalho, R. H. Hasue, P. B. Marschik, C. Einspieler, C. Janzen, J. D. Cherry, A. M. Bispo de Filippis and K. Nielsen-Saines (2016). "Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro." N Engl J Med 375(24): 2321-2334.

Cauchemez, S., M. Besnard, P. Bompard, T. Dub, P. Guillemette-Artur, D. Eyrolle-Guignot, H. Salje, M. D. Van Kerkhove, V. Abadie, C. Garel, A. Fontanet and H. P. Mallet (2016). "Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study." Lancet 387(10033): 2125-2132.

Faizan, M. I., M. Abdullah, S. Ali, I. H. Naqvi, A. Ahmed and S. Parveen (2016). "Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism." Intervirology 59(3): 152-158.

Li, H., L. Saucedo-Cuevas, S. Shresta and J. G. Gleeson (2016). "The Neurobiology of Zika Virus." Neuron 92(5): 949-958.

Liang, B., J. P. Guida, M. L. Costa Do Nascimento and I. U. Mysorekar (2019). "Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome." Virulence 10(1): 768-775.

Morris, G., T. Barichello, B. Stubbs, C. A. Kohler, A. F. Carvalho and M. Maes (2018). "Zika Virus as an Emerging Neuropathogen: Mechanisms of Neurovirulence and Neuro-Immune Interactions." Mol Neurobiol 55(5): 4160-4184.

Olagnier, D., M. Muscolini, C. B. Coyne, M. S. Diamond and J. Hiscott (2016). "Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis." DNA Cell Biol 35(8): 367-372.

Pardy, R. D. and M. J. Richer (2019). "Zika Virus Pathogenesis: From Early Case Reports to Epidemics." Viruses 11(10).

Pomar, L., D. Musso, G. Malinger, M. Vouga, A. Panchaud and D. Baud (2019). "Zika virus during pregnancy: From maternal exposure to congenital Zika virus syndrome." Prenat Diagn 39(6): 420-430.

Russo, F. B. and P. C. B. Beltrao-Braga (2017). "The impact of Zika virus in the brain." Biochem Biophys Res Commun 492(4): 603-607.

Vhp, L., M. M. Aragao, R. S. Pinho, A. N. Hazin, A. R. Paciorkowski, A. C. Penalva de Oliveira and M. R. Masruha (2020). "Congenital Zika Virus Infection: a Review with Emphasis on the Spectrum of Brain Abnormalities." Curr Neurol Neurosci Rep 20(11): 49.

Wen, Z., H. Song and G. L. Ming (2017). "How does Zika virus cause microcephaly?" Genes Dev 31(9): 849-861.

Acosta-Ampudia, Y., D. M. Monsalve, L. F. Castillo-Medina, Y. Rodriguez, Y. Pacheco, S. Halstead, H. J. Willison, J. M. Anaya and C. Ramirez-Santana (2018). "Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection." Front Mol Neurosci 11: 116.

Barbi, L., A. V. C. Coelho, L. C. A. Alencar and S. Crovella (2018). "Prevalence of Guillain-Barre syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis." Braz J Infect Dis 22(2): 137-141.

Brasil, P., P. C. Sequeira, A. D. Freitas, H. E. Zogbi, G. A. Calvet, R. V. de Souza, A. M. Siqueira, M. C. de Mendonca, R. M. Nogueira, A. M. de Filippis and T. Solomon (2016). "Guillain-Barre syndrome associated with Zika virus infection." Lancet 387(10026): 1482.

Cao-Lormeau, V. M., A. Blake, S. Mons, S. Lastere, C. Roche, J. Vanhomwegen, T. Dub, L. Baudouin, A. Teissier, P. Larre, A. L. Vial, C. Decam, V. Choumet, S. K. Halstead, H. J. Willison, L. Musset, J. C. Manuguerra, P. Despres, E. Fournier, H. P. Mallet, D. Musso, A. Fontanet, J. Neil and F. Ghawche (2016). "Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study." Lancet 387(10027): 1531-1539.

Lucchese, G. and D. Kanduc (2016). "Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barre syndrome, and beyond." Autoimmun Rev 15(8): 801-808.

Mancera-Paez, O., G. C. Roman, R. Pardo-Turriago, Y. Rodriguez and J. M. Anaya (2018). "Concurrent Guillain-Barre syndrome, transverse myelitis and encephalitis post-Zika: A case report and review of the pathogenic role of multiple arboviral immunity." J Neurol Sci 395: 47-53.

Munoz, L. S., B. Parra, C. A. Pardo and S. Neuroviruses Emerging in the Americas (2017). "Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults." J Infect Dis 216(suppl\_10): S897-S905.

Pardy, R. D. and M. J. Richer (2019). "Zika Virus Pathogenesis: From Early Case Reports to Epidemics." Viruses 11(10).

Parra, B., J. Lizarazo, J. A. Jimenez-Arango, A. F. Zea-Vera, G. Gonzalez-Manrique, J. Vargas, J. A. Angarita, G. Zuniga, R. Lopez-Gonzalez, C. L. Beltran, K. H. Rizcala, M. T. Morales, O. Pacheco, M. L. Ospina, A. Kumar, D. R. Cornblath, L. S. Munoz, L. Osorio, P. Barreras and C. A. Pardo (2016). "Guillain-Barre Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia." N Engl J Med 375(16): 1513-1523.

Rodriguez, Y., M. Rojas, Y. Pacheco, Y. Acosta-Ampudia, C. Ramirez-Santana, D. M. Monsalve, M. E. Gershwin and J. M. Anaya (2018). "Guillain-Barre syndrome, transverse myelitis and infectious diseases." Cell Mol Immunol 15(6): 547-562.

- Estrela, P. F. N., G. M. Mendes, K. G. de Oliveira, A. M. Bailao, C. M. A. Soares, N. A. Assuncao and G. R. M. Duarte (2019). "Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP." J Virol Methods 271: 113675.
- Landry, M. L. and K. St George (2017). "Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection." Arch Pathol Lab Med 141(1): 60-67.
- Munoz-Jordan, J. L. (2017). "Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities." J Infect Dis 216(suppl\_10): S951-S956.
- Musso, D. and D. J. Gubler (2016). "Zika Virus." Clin Microbiol Rev 29(3): 487-524.
- Peters, R. and M. Stevenson (2019). "Zika virus diagnosis: challenges and solutions." Clin Microbiol Infect 25(2): 142-146.
- Silva, S., M. H. S. Paiva, D. R. D. Guedes, L. Krokovsky, F. L. Melo, M. Silva, A. D. Silva, C. F. J. Ayres and L. J. Pena (2019). "Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil." Sci Rep 9(1): 4494.
- Silva, S., K. Pardee and L. Pena (2019). "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review." Viruses 12(1).
- Singh, R. K., K. Dhama, K. Karthik, R. Tiwari, R. Khandia, A. Munjal, H. M. N. Iqbal, Y. S. Malik and R. Bueno-Mari (2017). "Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update." Front Microbiol 8: 2677.
- Barrett, A. D. T. (2018). "Current status of Zika vaccine development: Zika vaccines advance into clinical evaluation." NPJ Vaccines 3: 24.
- da Silva, S., D. Oliveira Silva Martins and A. C. G. Jardim (2018). "A Review of the Ongoing Research on Zika Virus Treatment." Viruses 10(5).
- Evans-Gilbert, T. (2020). "Vertically transmitted chikungunya, Zika and dengue virus infections: The pathogenesis from mother to fetus and the implications of co-infections and vaccine development." Int J Pediatr Adolesc Med 7(3): 107-111.
- Garg, H., T. Mehmetoglu-Gurbuz and A. Joshi (2018). "Recent Advances in Zika Virus Vaccines." Viruses 10(11).
- Gaudinski, M. R., K. V. Houser, K. M. Morabito, Z. Hu, G. Yamshchikov, R. S. Rothwell, N. Berkowitz, F. Mendoza, J. G. Saunders, L. Novik, C. S. Hendel, L. A. Holman, I. J. Gordon, J. H. Cox, S. Edupuganti, M. A. McArthur, N. G. Roupheal, K. E. Lyke, G. E. Cummings, S. Sitar, R. T. Bailer, B. M. Foreman, K. Burgomaster, R. S. Pelc, D. N. Gordon, C. R. DeMaso, K. A. Dowd, C. Laurencot, R. M. Schwartz, J. R. Mascola, B. S. Graham, T. C. Pierson, J. E. Ledgerwood, G. L. Chen, Vrc and V. R. C. s. teams (2018). "Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials." Lancet 391(10120): 552-562.
- Jagger, B. W., K. A. Dowd, R. E. Chen, P. Desai, B. Foreman, K. E. Burgomaster, S. Himansu, W. P. Kong, B. S. Graham, T. C. Pierson and M. S. Diamond (2019). "Protective

- Efficacy of Nucleic Acid Vaccines Against Transmission of Zika Virus During Pregnancy in Mice." J Infect Dis 220(10): 1577-1588.
- Makhluf, H. and S. Shresta (2018). "Development of Zika Virus Vaccines." Vaccines (Basel) 6(1).
- Mao, H. H. and S. Chao (2020). "Advances in Vaccines." Adv Biochem Eng Biotechnol 171: 155-188.
- Modjarrad, K., L. Lin, S. L. George, K. E. Stephenson, K. H. Eckels, R. A. De La Barrera, R. G. Jarman, E. Sondergaard, J. Tennant, J. L. Ansel, K. Mills, M. Koren, M. L. Robb, J. Barrett, J. Thompson, A. E. Kosel, P. Dawson, A. Hale, C. S. Tan, S. R. Walsh, K. E. Meyer, J. Brien, T. A. Crowell, A. Blazevic, K. Mosby, R. A. Larocca, P. Abbink, M. Boyd, C. A. Bricault, M. S. Seaman, A. Basil, M. Walsh, V. Tonwe, D. F. Hoft, S. J. Thomas, D. H. Barouch and N. L. Michael (2018). "Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials." Lancet 391(10120): 563-571.
- Muthumani, K., B. D. Griffin, S. Agarwal, S. B. Kudchodkar, E. L. Reuschel, H. Choi, K. A. Kraynyak, E. K. Duperret, A. A. Keaton, C. Chung, Y. K. Kim, S. A. Booth, T. Racine, J. Yan, M. P. Morrow, J. Jiang, B. Lee, S. Ramos, K. E. Broderick, C. C. Reed, A. S. Khan, L. Humeau, K. E. Ugen, Y. K. Park, J. N. Maslow, N. Y. Sardesai, J. Joseph Kim, G. P. Kobinger and D. B. Weiner (2016). "In vivo protection against ZIKV infection and pathogenesis through passive antibody transfer and active immunisation with a prMEnv DNA vaccine." NPJ Vaccines 1: 16021.
- Pattnaik, A., B. R. Sahoo and A. K. Pattnaik (2020). "Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges." Vaccines (Basel) 8(2).
- Plotkin, S., J. M. Robinson, G. Cunningham, R. Iqbal and S. Larsen (2017). "The complexity and cost of vaccine manufacturing - An overview." Vaccine 35(33): 4064-4071.
- Quanquin, N., L. Wang and G. Cheng (2017). "Potential for treatment and a Zika virus vaccine." Curr Opin Pediatr 29(1): 114-121.
- Richner, J. M., B. W. Jagger, C. Shan, C. R. Fontes, K. A. Dowd, B. Cao, S. Himansu, E. A. Caine, B. T. D. Nunes, D. B. A. Medeiros, A. E. Muruato, B. M. Foreman, H. Luo, T. Wang, A. D. Barrett, S. C. Weaver, P. F. C. Vasconcelos, S. L. Rossi, G. Ciaramella, I. U. Mysorekar, T. C. Pierson, P. Y. Shi and M. S. Diamond (2017). "Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease." Cell 170(2): 273-283 e212.
- Saiz, J. C. (2019). "Therapeutic Advances Against ZIKV: A Quick Response, a Long Way to Go." Pharmaceuticals (Basel) 12(3).
- Shan, C., A. E. Muruato, B. T. D. Nunes, H. Luo, X. Xie, D. B. A. Medeiros, M. Wakamiya, R. B. Tesh, A. D. Barrett, T. Wang, S. C. Weaver, P. F. C. Vasconcelos, S. L. Rossi and P. Y. Shi (2017). "A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models." Nat Med 23(6): 763-767.
- Silva, N. M., N. C. Santos and I. C. Martins (2020). "Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines." Trop Med Infect Dis 5(4).

- Tebas, P., C. C. Roberts, K. Muthumani, E. L. Reuschel, S. B. Kudchodkar, F. I. Zaidi, S. White, A. S. Khan, T. Racine, H. Choi, J. Boyer, Y. K. Park, S. Trottier, C. Remigio, D. Krieger, S. E. Spruill, M. Bagarazzi, G. P. Kobinger, D. B. Weiner and J. N. Maslow (2017). "Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine - Preliminary Report." N Engl J Med.
- Albulescu, I. C., K. Kovacicova, A. Tas, E. J. Snijder and M. J. van Hemert (2017). "Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles." Antiviral Res 143: 230-236.
- Alves, M. P., N. J. Vielle, V. Thiel and S. Pfaender (2018). "Research Models and Tools for the Identification of Antivirals and Therapeutics against Zika Virus Infection." Viruses 10(11).
- Baz, M. and G. Boivin (2019). "Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections." Pharmaceuticals (Basel) 12(3).
- Bernatchez, J. A., L. T. Tran, J. Li, Y. Luan, J. L. Siqueira-Neto and R. Li (2020). "Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection." J Med Chem 63(2): 470-489.
- Carneiro, B. M., M. N. Batista, A. C. S. Braga, M. L. Nogueira and P. Rahal (2016). "The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry." Virology 496: 215-218.
- da Silva, S., D. Oliveira Silva Martins and A. C. G. Jardim (2018). "A Review of the Ongoing Research on Zika Virus Treatment." Viruses 10(5).
- Delvecchio, R., L. M. Higa, P. Pezzuto, A. L. Valadao, P. P. Garcez, F. L. Monteiro, E. C. Loiola, A. A. Dias, F. J. Silva, M. T. Aliota, E. A. Caine, J. E. Osorio, M. Bellio, D. H. O'Connor, S. Rehen, R. S. de Aguiar, A. Savarino, L. Campanati and A. Tanuri (2016). "Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models." Viruses 8(12).
- Gorshkov, K., S. A. Shiryaev, S. Fertel, Y. W. Lin, C. T. Huang, A. Pinto, C. Farhy, A. Y. Strongin, W. Zheng and A. V. Terskikh (2018). "Zika Virus: Origins, Pathological Action, and Treatment Strategies." Front Microbiol 9: 3252.
- Kuivanen, S., M. M. Bepalov, J. Nandania, A. Ianevski, V. Velagapudi, J. K. De Brabander, D. E. Kainov and O. Vapalahti (2017). "Obatoclox, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism." Antiviral Res 139: 117-128.
- Lim, H. J., T. T. Nguyen, N. M. Kim, J. S. Park, T. S. Jang and D. Kim (2017). "Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of ZIKA virus and their structure activity relationship." Biotechnol Lett 39(3): 415-421.
- Mottin, M., J. Borba, R. C. Braga, P. H. M. Torres, M. C. Martini, J. L. Proenca-Modena, C. C. Judice, F. T. M. Costa, S. Ekins, A. L. Perryman and C. Horta Andrade (2018). "The A-Z of Zika drug discovery." Drug Discov Today 23(11): 1833-1847.
- Qadir, A., M. Riaz, M. Saeed and S. Shahzad-UI-Hussan (2018). "Potential targets for therapeutic intervention and structure based vaccine design against Zika virus." Eur J Med Chem 156: 444-460.

Wang, B., S. Thurmond, R. Hai and J. Song (2018). "Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design." Cell Mol Life Sci 75(10): 1723-1736.

Wang, X., P. Zou, F. Wu, L. Lu and S. Jiang (2017). "Development of small-molecule viral inhibitors targeting various stages of the life cycle of emerging and re-emerging viruses." Front Med 11(4): 449-461.

Zmurko, J., R. E. Marques, D. Schols, E. Verbeken, S. J. Kaptein and J. Neyts (2016). "The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model." PLoS Negl Trop Dis 10(5): e0004695.

# **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIVIRAL DE COMPOSTOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS DERIVADOS DA VANILINA CONTRA O ZIKA VÍRUS**

**AUTORES:** João Vitor Da Silva Rodrigues<sup>1</sup>, Iago da Cruz Pereira<sup>1</sup>, Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla<sup>2</sup>, Roberto Sousa Dias<sup>1</sup>, Italo Esposti Poly da Silva<sup>4</sup>, John Willians Oliveira Prates<sup>1</sup>, Isabela de Souza Gomes<sup>3</sup>, Róbson Ricardo Teixeira<sup>2</sup>, Sabrina de A. Silveira<sup>3</sup>, Sérgio Oliveira de Paula<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunovirologia Molecular, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciência da Computação, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

<sup>4</sup>Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Centro de Química Medicinal CQMED.

## RESUMO

O vírus da Zika (ZIKV) pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivírus*, foi isolado primeiramente de macacos *rhesus* em 1947 na floresta Zika em Uganda e desde então obteve disseminação favorável nas Américas. Devido às inúmeras infecções e complicações clínicas em populações humanas, favorecido pela ampla distribuição do mosquito vetor e à subnotificação dos casos e, sobretudo, devido à relação próxima com outros *Flavivírus* (dengue, chikungunya e febre Amarela), se tornou um arbovírus de impacto significativo na saúde pública. No Brasil a linhagem predominante de circulação é a asiática, que vem promovendo surtos desde 2015 e está diretamente relacionado á microcefalia em neonatos, já em adultos causa a Síndrome de Guillain-Barré. Recentemente, em meados do final de 2018 e início de 2019, pesquisadores identificaram cepas da linhagem africana circulando no Brasil com potencial de provocar uma nova epidemia. Atualmente não existe tratamento específico para febre do Zika, estando disponível apenas analgésicos e antitérmicos para alívio dos sintomas e bem estar dos pacientes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito antiviral de compostos 1,2,3 triazólicos derivados da vanilina e estabelecer seus mecanismos de ação contra o ZIKV. Para isso foi avaliada a citotoxicidade de 15 compostos, seguido da ação antiviral através do ensaio de inibição por placa de lise. Em seguida o composto que obteve o melhor índice de seletividade foi avaliado quanto ao seu mecanismo de ação pelos ensaios de pré e pós-tratamento, além da inibição da internalização e adsorção; análises de cinética, microscopia eletrônica, docking molecular e potencial Zeta foram performadas com o objetivo de elucidar as possíveis interações entre o composto e o ZIKV. Os resultados demonstram que a combinação dos valores de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) e o ensaio de inibição (CE<sub>50</sub>) revelam índices de seletividade significativos da maioria dos compostos testados. O mecanismo de ação foi avaliado indicando uma inibição da entrada do ZIKV *in vitro* pela possível interação com a proteína E do envelope. A análise de docking molecular indicou uma interação favorável do composto com as regiões das extremidades e central da proteína E sugerindo uma possível estabilização dessas regiões impedindo a interação da proteína com o receptor celular, e consequentemente a interação com os fatores e receptores de entrada. A análise do potencial zeta mostrou uma redução estatisticamente significativa da carga (mV) do ZIKV tratado em relação ao não-tratado, indicando interação entre o ZIKV e o composto. Conclui-se portanto que compostos derivados da Vanilina contendo núcleos 1,2,3 triazólicos podem ser drogas antivirais promissoras contra o ZIKV.

**PALAVRAS CHAVE:** Zika vírus. Vanilina. Núcleos Triazólicos. Antiviral

## ABSTRACT

The Zika Virus (ZIKV) belongs to the *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus, was isolated first from *rhesus* monkey in 1947 in Zika forest in Uganda and since then obtained favorable dissemination in the Americas. Due to the countless infections and clinical issues in human populations, favored by wide distribution of insect vector and underreporting of cases by closer relation with other *Flavivirus* (Dengue, Chikungunya and Yellow Fever virus), it becomes an arbovirus with significant impact on public health. In Brazil the predominant strain of circulation is the Asian promoting outbreaks started in 2015 and directly related with microcephaly in newborns and Guillain-Barre syndrome in adults. Recently researchers identified a new African strain circulating in Brazil in mid-end 2018 and beginning of 2019, with potential to provoke a new epidemic. There is no specific treatment for Zika syndrome so far, just available analgesics and anti-thermal for relief of symptoms and well-being of patients. Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential antiviral effect of compounds 1,2,3 triazoles from vanillin and its action mechanisms against ZIKV. Were evaluated the cytotoxicity of 15 compounds and next evaluation of antiviral action through the viral inhibition assay by lysis plate. Posteriorly the compound that obtained the best Selectivity Index was assayed for action mechanisms by pre and post treatment assays and internalization and adsorption inhibition; analyzes of kinetic, electronic microscopy, molecular docking and zeta potential were performed in intention of clarify interactions between the compounds and ZIKV. The results showed that combination of cytotoxicity values ( $IC_{50}$ ) and inhibition assay ( $EC_{50}$ ) reveal significant selectivity index of most compounds initially tested. These compounds showed statistically significant antiviral actions in inhibition of ZIKV infection *in vitro* (VERO cells). Therefore, its action mechanisms were evaluated indicating an adsorption inhibition of ZIKV *in vitro* through possible interaction with E protein envelope. Molecular docking reveals a favorable interaction of compound with central and extremities regions from E protein. The analyzes of zeta potential showed a statistically significant reduction in charge (mV) of ZIKV treated with compound than when compared with ZIKV only, indicating an interaction with ZIKV and compound. Therefore, it is concluded that compounds 1,2,3 triazoles from vanillin may be promising antiviral drugs against ZIKV and can be acting by inhibition of adsorption by possible interaction with E protein.

**KEYWORDS:** Zika Virus. Vanillin. Triazoles. Antiviral

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

### **4.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS DA VANILINA COM NÚCLEOS TRIAZÓLICOS**

Os 15 derivados 1,2,3 triazólicos avaliados no presente trabalho foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo, Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos- GSPCB, do departamento de química da Universidade Federal de Viçosa, coordenado pelo professor Róbson Ricardo Teixeira.

### **4.2 CULTURA CELULAR E ESTOQUE VIRAL**

As culturas de células VERO (ATCC® CCL-81™), que são culturas contínuas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e células de inseto *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC® CRL-1660™), foram utilizados para os experimentos in vitro. O estoque viral foi preparado por passagens sucessivas da cepa de ZIKV (ZIKV/sapiens/BRAZIL/PE243/2015) em células C6/36. Um frasco de cultura (75 cm<sup>2</sup>) com células C6/36 90% confluentes contendo 7 ml de meio L15 ( MEIO LEBOVITZ'S L-15) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) foi inoculado com 1 ml da cepa de ZIKV e mantido durante 1 hora no homogeneizador para adsorção viral. Após 7 dias incubado em estufa a 28°C o meio foi removido e centrifugado a 800xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as partículas virais foi suplementado com 10% de SFB, aliquotado e armazenado a -80°C. As células Vero foram mantidas a 37°C em uma estufa com 5% de CO<sup>2</sup> e nutrida com uma solução de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e utilizadas para análises posteriores (Monteiro, Oliveira et al. 2018).

### **4.3 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO VIRAL**

Células Vero confluentes cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB em garrafas de cultura celular (75 cm<sup>2</sup>) em estufa de CO<sup>2</sup> a 5% foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 1,5 X10<sup>4</sup> por poço. Após atingir a confluência foram

infectadas com 100  $\mu\text{L}$  de diluições seriadas (triplicata) dos estoques virais (diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ), em meio DMEM incompleto. As placas foram incubadas por 1 hora, sob agitação para adsorção viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e posteriormente adicionado a cada cavidade 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução CMC 3% em meio DMEM incompleto. Após decorrido o período de 6 dias as células foram fixadas com formaldeído 20%, e coradas pela adição de 2 a 3 gotas do corante cristal violeta 5% por 25 minutos, a temperatura ambiente, em agitador mecânico. O título viral, portanto foi definido pelo número de unidades formadoras de placas (UFP) visualizadas a olho nu (MONTEIRO *et al.*, 2018).

#### **4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE**

A Fim de determinar a concentração que diminui 50% da viabilidade celular ( $CC_{50}$ ), compostos teste selecionados foram submetidos ao ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo). Uma suspensão de células VERO, contendo aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi semeada em uma placa de 96 cavidades por poço (100  $\mu\text{L}$ /cavidade). Após 24 horas ou até atingir confluência, as células foram submetidas a uma série de diluições dos compostos testes em meio DMEM incompleto, iniciando pela concentração de 1000  $\mu\text{mol L}$ . As diluições foram incubadas por 24 horas a 37% numa atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Logo após, o meio foi então removido e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de MTT (0,5 mg/mL), e incubada novamente por 4 h a 37 °C. O meio com MTT foi removido e substituído por 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimetil sulfóxido) por poço para dissolver os cristais de formazan. Posteriormente a placa foi agitada por 20 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de  $CC_{50}$ , ou seja, a concentração de cada material teste que reduziu em 50% a viabilidade celular foi obtida por análise de regressão não linear dos percentuais referentes às diferentes concentrações dos compostos. Os testes foram realizados no Graphpad Prism 7 e os valores de  $CC_{50}$  representaram a média de três experimentos independentes (Oliveira, de Souza et al. 2018).

#### **4.5 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL PELO ENSAIO VIRUCIDA**

Para determinar a ação direta dos compostos sobre a partícula viral o ensaio de formação de placa foi performed. Células VERO foram cultivadas em placas de 24 cavidades e

submetidas a uma solução previamente incubada por 1 hora a 37°C, contendo 200 µL de suspensão viral (200 UFP) incubados com 200 µL de variadas concentrações a partir do CC<sub>50</sub> dos compostos testes. As placas contendo a mistura de suspensão viral com as variadas concentrações dos compostos foram deixadas sob agitação para uma melhor distribuição viral por 1 hora. Após esse tempo, a suspensão foi aspirada e então foi adicionado a cada cavidade 1000 µL de uma solução CMC 3% em meio DMEM incompleto. As placas foram incubadas 6 dias e após este período as células fixadas e coradas com cristal violeta. Baseado no número de placas de lise foi possível determinar a dose-reposta e o valor da concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) que reduz a infectividade viral. Neste ensaio foi possível calcular o valor do CE<sub>50</sub> através de regressão dos percentuais de inibição referentes às diferentes concentrações dos compostos teste com o Graphpad Prism 7. Com o valor de CC<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub> foi possível calcular o valor do índice de seletividade (IS), que corresponde à razão do CC<sub>50</sub> sobre o CE<sub>50</sub> (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

#### **4.6 ENSAIO DOS MECANISMOS DE AÇÃO**

A fim de determinar os diferentes mecanismos pelo qual o composto selecionado atua sobre a partícula viral ou diretamente sobre as células, um ensaio de formação de placa foi conduzido sob diferentes condições.

#### **4.7 ENSAIO DE PRÉ TRATAMENTO E PROTEÇÃO CELULAR**

Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades a uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  com meio DMEM suplementado com 10 % de SFB, e incubados a 37 °C á 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem confluência, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações a partir do CC<sub>50</sub> dos compostos testes selecionados, que ficaram em contato com o tapete celular por 3 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido este período, os compostos foram cuidadosamente aspirados, a placa lavada com meio DMEM e posteriormente foram adicionados 100 µL da suspensão viral (100 UFP). Na mesma placa, foram realizados controle celular (100 µL meio/cavidade) e controle viral (100 µL suspensão viral/cavidade, 100 UFP). As placas foram incubadas por 1 hora no homogeneizador. Posteriormente o sobrenadante foi removido e adicionado a cada cavidade 1000 µL de uma solução CMC 3%

em meio DMEM incompleto. As placas foram incubadas por 6 dias e após esse período, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas como descrito no acima (Poly da Silva, Lopes da Silva et al. 2020).

#### **4.8 ENSAIO DE PÓS TRATAMENTO**

Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades a uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  com meio DMEM suplementado com 10 % de SFB, e incubados a 37 °C á 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem confluência, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µL da suspensão viral (100 UFP/mL) sobre a camada celular. Na mesma placa, foram realizados controle celular (100 µL meio/cavidade) e controle viral (100 µL suspensão viral/cavidade, 100 UFP/mL). As placas foram incubadas por 1 hora nas mesmas condições citadas anteriormente para adsorção viral. Posteriormente, a suspensão viral foi removida e adicionado 100 µL das diferentes concentrações dos compostos selecionados. As placas foram incubadas por 3 h nas mesmas condições citadas anteriormente. Decorrido esse período, os compostos foram aspirados e foi adicionado 1000 µL de uma solução CMC 3% em meio DMEM incompleto. As placas foram incubadas por 6 dias. Passado esse período, as células foram fixadas e coradas como descrito acima (MONTEIRO *et al.*, 2018).

#### **4.9 ENSAIO DA INIBIÇÃO DA ADSORÇÃO**

Este ensaio foi conduzido com duas abordagens diferentes, mostrando a capacidade do composto inibir a adsorção sem contato prévio com a suspensão viral e após contato prévio com a solução viral (Adaptado de (Poly da Silva, Lopes da Silva et al. 2020)). Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades a uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  com meio DMEM suplementado com 10 % de SFB, e incubados a 37 °C á 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem confluência, a placa foi resfriada a 4°C por 30 minutos. Subsequentemente o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL das diferentes concentrações dos compostos juntamente com a solução viral (100 UFP/mL) e ou 100 µL da solução viral previamente tratada com as diferentes concentrações dos compostos testes selecionados. Na mesma placa, foram realizados controle celular (100 µL meio/cavidade) e controle viral (100 µL suspensão viral/cavidade, 100 UFP/mL). As placas foram incubadas por 2 horas em temperatura de 4°C. Decorrido esse

período as soluções foram aspiradas e as cavidades foram lavadas com PBS 1X e foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução CMC 3% em meio DMEM incompleto. As placas foram incubadas por 6 dias e decorrido este período as células foram fixadas e coradas como descrito acima.

#### **4.10 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO**

Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades a uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  com meio DMEM suplementado com 10 % de SFB, e incubados a  $37^\circ\text{C}$  á 5% de  $\text{CO}_2$ . Após atingirem confluência a placa foi resfriada a  $4^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Decorrido esse período o sobrenadante foi removido e adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução viral (100 UFP/mL). A placa foi incubada novamente à  $4^\circ\text{C}$  por 2 horas e subsequentemente foi lavada com solução de PBS e adicionado a cada poço 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução DMEM incompleta . A placa foi incubada por 5 minutos em uma estufa de  $37^\circ\text{C}$ . Após esse período o sobrenadante foi aspirado e as cavidades da placa foram preenchidas com diferentes concentrações dos compostos e novamente foi incubada por 1 hora em estufa de  $37^\circ\text{C}$ . Passados esse período, os compostos foram aspirados e foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução CMC 3% em meio DMEM incompleto. As placas foram incubadas por 6 dias e após esse período, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas como descrito acima (MONTEIRO *et al.*, 2018).

#### **4.11 ENSAIO VIRUCIDA TEMPO DEPENDENTE**

Para determinar a cinética de tempo da ação direta dos compostos sobre a partícula viral, o ensaio de formação de placa foi performedo ( Adaptado de (Poly da Silva, Lopes da Silva et al. 2020). Células VERO foram cultivadas em placas de 24 cavidades e submetidas a soluções previamente incubadas por 80,70,60,50,40,30,20, 10 e 0 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , contendo 200  $\mu\text{L}$  de suspensão viral (200 UFP) incubados com 200  $\mu\text{L}$  do composto selecionado na maior concentração não citotóxica. As placas contendo a mistura de suspensão viral com a maior concentração não citotóxica em diferentes tempos foram deixadas sob agitação para uma melhor distribuição viral por 1 hora. Após esse tempo, a suspensão foi aspirada e então foi adicionado a cada cavidade 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução CMC 3% em meio DMEM incompleto. As placas foram incubadas 6 dias e após este período as células fixadas e coradas com cristal

violeta. Baseado no número de placas de lise foi possível determinar o tempo de contato do composto sobre a partícula viral capaz de reduzir a infecção viral.

#### **4.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

Cerca de 10 microlitros de Zika BR purificado, tratado ou não com o composto 1, foram colocados em uma grade de cobre coberta com Formvar por 5 min. O acetato de uranila a 5% foi usado para contrastar. As imagens foram capturadas em um microscópio eletrônico Zeiss 109 ( Adaptado de (Neris, Figueiredo et al. 2018).

#### **4.13 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA**

O potencial zeta foi utilizado para mensurar a carga elétrica da partícula viral tratada ou não tratada com os compostos selecionados. Para isso, foi utilizado o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. UK.). As medidas foram realizadas a 24°C usando capilaridade celular sobre um tempo equilibrado de 120s. Três medidas de 10 a 100 corridas foram realizadas usando a opção automodo. Um volume de 800 µL de uma suspensão viral (  $2,1 \times 10^5$  UFP/mL) diluídos em água ultrapura e 800 µL da suspensão viral pré incubado com o composto selecionado a uma concentração de 334.9 µM por 1 hora a 37° foram utilizados para mensurar a carga elétrica de superfície. Todos os experimentos foram realizados em um ambiente neutro de pH e a água foi usada como dispersante. Zetasizer Software versão 7.03 foi usado para análise de dados (Poly da Silva, Lopes da Silva et al. 2020).

#### **4.14 ESTUDO DE MODELAGEM COMPUTACIONAL- DOCKING**

Inicialmente, foi realizado um docking global para verificar a posição do sítio de ligação na proteína E (PDB código 5JHM). O docking global consiste em permitir o ancoramento do ligante em qualquer região da proteína, a qual é completamente envolta pela caixa de simulação que foi desenhada no Autogrid do AutoDock Tool. A preparação das moléculas também foi feita no AutoDock Tool, sendo adicionados hidrogênios polares na proteína a fim de corrigir eventuais desprotonações equivocadas das estruturas. Para os ligantes, foi permitido que as

ligações torcionáveis pudessem ser livres para executar tal movimento durante a simulação. As moléculas foram salvas no formato pdbqt e usadas de input no AutoDock Vina, para geração de cinco poses conformacionais para cada ligante. Subsequentemente, foi definida a região preferencial de ligação da proteína e foram realizados dockings locais. Na E, tanto o centro quanto às cavidades da extremidade se destacaram como região de interação, portanto foram realizados ensaios em ambas regiões. A caixa de simulação foi definida de forma semelhante ao ensaio global, contudo com dimensões reduzidas de modo a englobar somente os sítios identificados anteriormente. Para cada ligante, foram geradas novamente 5 poses em cada sítio de interação e os resultados da simulação foram analisados por mapas 2D de interação gerados no Biovia Discovery Studio 2020, pela confirmação tridimensional no Pymol e valores de ranking retornados pelo próprio vina (Seeliger and de Groot 2010).

#### **4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A significância estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism (Versão 6.0). A regressão não linear foi usada para determinar os valores de  $EC_{50}$  e  $CC_{50}$ . A comparação entre as colunas em diferentes ensaios foi conduzida utilizando a análise de variância (ANOVA).

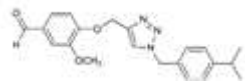
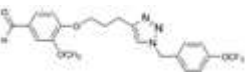
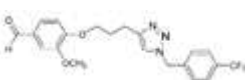
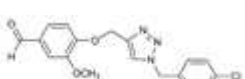
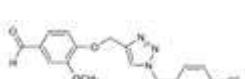
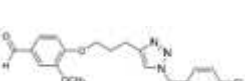
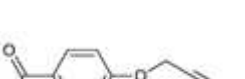

## 5 RESULTADOS

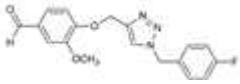
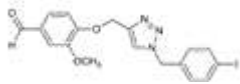
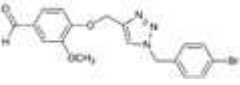
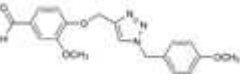
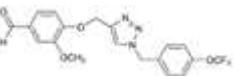
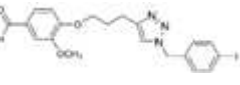
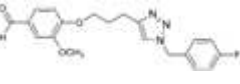
### 5.1 CITOTOXICIDADE E ÍNDICES DE SELETIVIDADE

Este trabalho teve como objetivo o significativo espectro de atividades da vanilina, bem como o de núcleos 1,2,3 triazólicos presentes em inúmeros fármacos. Os derivados triazólicos da vanilina aqui testados demonstraram baixa citotoxicidade em células vero e ação antiviral contra o ZIKV (Tabela 1). Um total de 15 compostos foram avaliados quanto sua citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) in vitro, performado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Todos os compostos apresentaram  $CC_{50}$  acima de 200  $\mu$ M, apresentando baixa citotoxicidade e nenhum efeito sobre a viabilidade celular, portanto, essas concentrações foram escolhidas para as análises subsequentes. A dose resposta que reduz a atividade viral foi determinada pelo valor da concentração efetiva ( $CE_{50}$ ), o composto 1 obteve  $CE_{50}$  de 27.14 se destacando em relação aos outros compostos. O composto 2 foi o segundo com melhor  $CE_{50}$  com valor de 34.11, os compostos 3, 6 e 14 obtiveram valores de  $CE_{50}$  satisfatórios abaixo de 100, respectivamente 70.09, 95 e 96.25. Já nos compostos 4, 5, 9 e 13 a concentração efetiva para redução da atividade viral foi estimada acima de 100, respectivamente 155, 156, 349,8 e 162. Uma razão dos valores de  $CC_{50}$  pelos valores de  $CE_{50}$  culminaram em Índices de Seletividade (IS) significativos da maioria dos compostos testados. O composto 1 foi o que obteve melhor índice de seletividade seguido dos compostos 2,3,5,4,14,6 e 13. Estes resultados indicam que derivados triazólicos da vanilina são candidatos promissores para potenciais fármacos antivirais.

Tabela 1: Estrutura dos compostos, ensaio de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ), Concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) e Índice de Seletividade (IS).

Composto	Estrutura	Citotoxicidade $CC_{50}$	Ensaio de Inibição $CE_{50}$	Índice de Seletividade (IS)

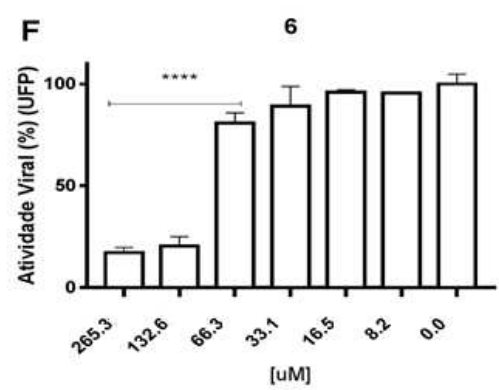
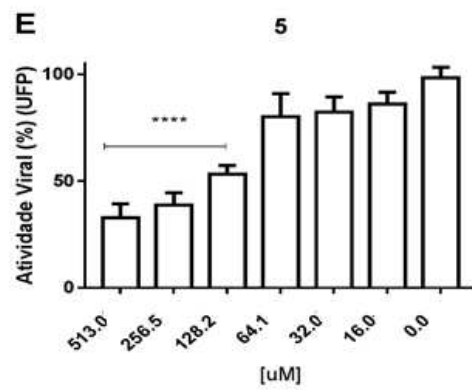
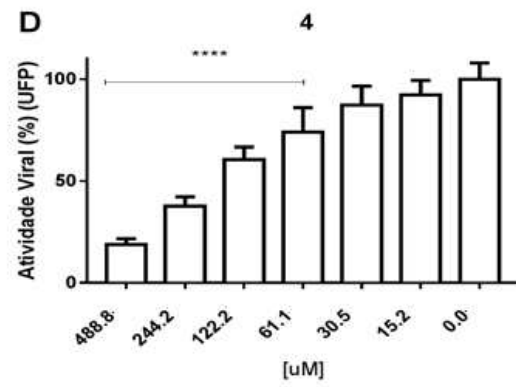
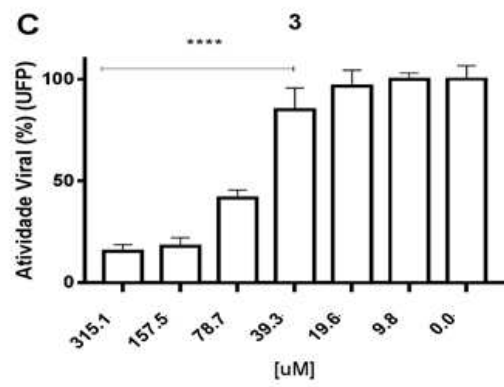
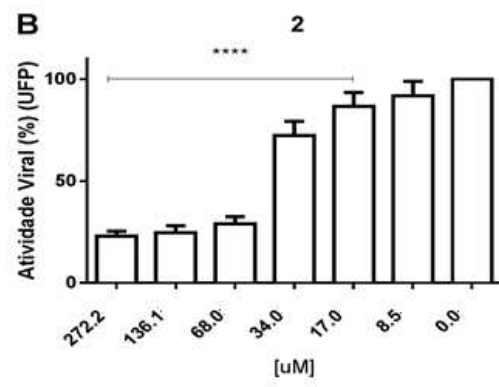
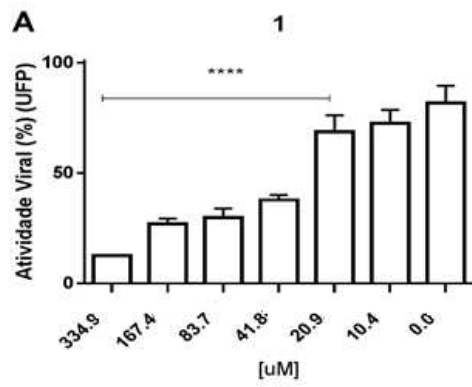
1		334.9 $\mu\text{M}$	27.14	12.3
2		272.2 $\mu\text{M}$	34.11	7.9
3		315.1 $\mu\text{M}$	70.29	4.4
4		488.8 $\mu\text{M}$	155	3.1
5		513 $\mu\text{M}$	156	3.2
6		265.3 $\mu\text{M}$	95	2.7
7		590 $\mu\text{M}$	2269	0,2
8		564.7 $\mu\text{M}$	5961	0,09
9				

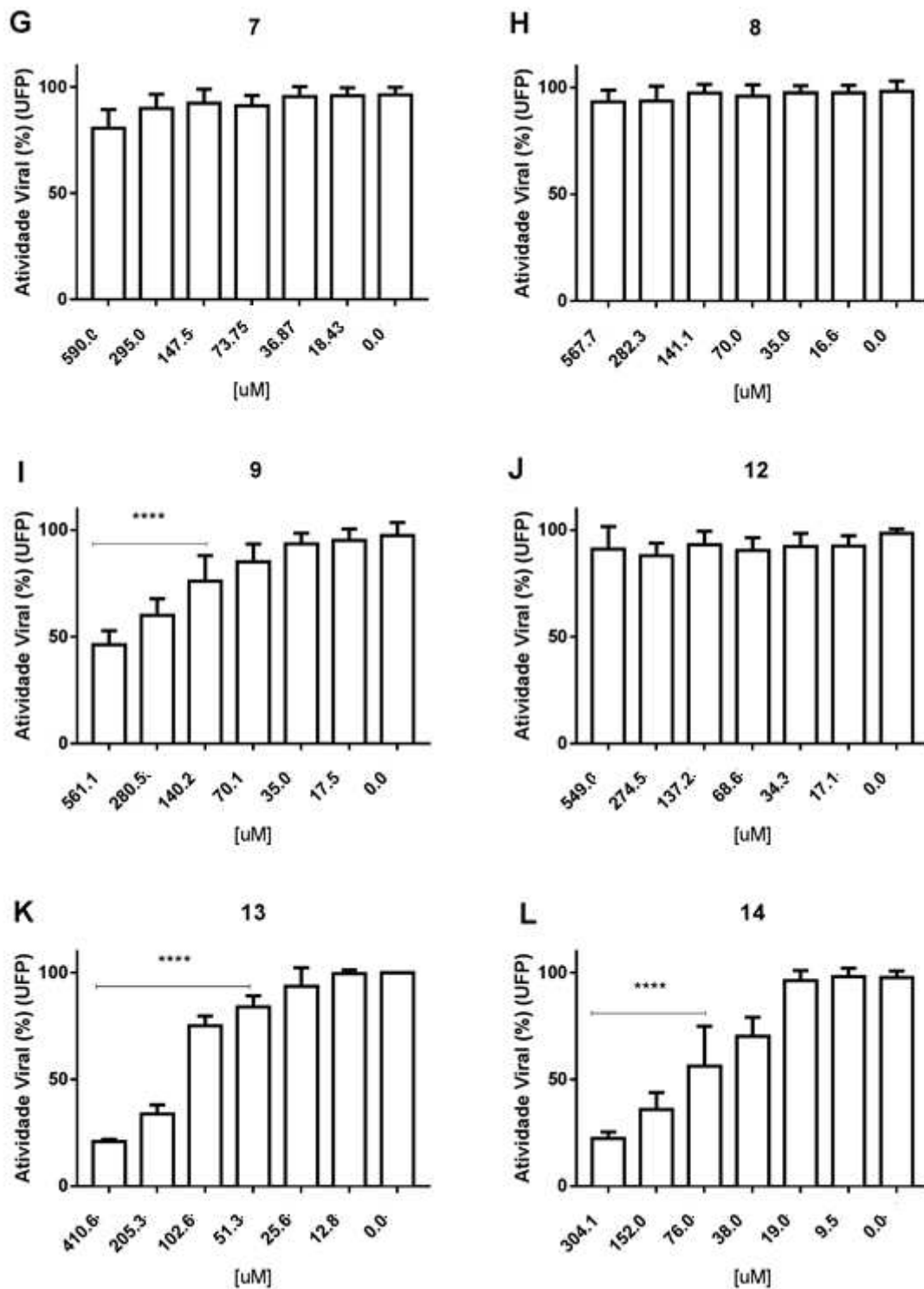
		561.1 $\mu\text{M}$	349,8	1,6
10		396.3 $\mu\text{M}$		
11		493.6 $\mu\text{M}$		
12		549 $\mu\text{M}$	3248	0,1
13		410.6 $\mu\text{M}$	162	2,5
14		304.1 $\mu\text{M}$	96,25	3,1
15		333.6 $\mu\text{M}$		

---

## **5.2 DERIVADOS 1,2,3 TRIAZÓLICOS DA VANILINA INTERAGEM COM A PARTÍCULA VIRAL E REDUZ A INFECTIVIDADE DO ZIKA IN VITRO**

A ação direta dos compostos sobre a partícula viral foi avaliada pela redução na formação de placas. Aqueles compostos que tiveram a capacidade de reduzir a infecção viral possuem uma atividade virucida contra o Zika, impedindo que o vírus possa progredir com seu ciclo infeccioso (Figura 1). Dos 12 compostos testados, 9 foram estatisticamente significativos na redução da atividade viral, que são os compostos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 13, 14. O composto 1 (Fig 1A) foi o que obteve melhor índice de seletividade, consequência da sua capacidade de reduzir em até 50% a atividade viral em uma concentração de 41.8  $\mu\text{M}$ . Os compostos 2 e 3 (Fig 1B e C) reduziram a atividade viral em 50% até quando foram diluídos 3 vezes sob concentrações de 68 $\mu\text{M}$  e 78  $\mu\text{M}$  respectivamente. Já os compostos 4, 5, 6, 9, 13, 14 (Fig 1 D, E, F, I, K, L) apresentaram ação sobre a partícula viral e capacidade de reduzir em 50% a atividade viral em concentrações acima de 100  $\mu\text{M}$ . Os compostos 7, 8 e 12 não foram efetivos em reduzir a infectividade viral e, portanto, apresentaram índices de seletividade não significativos e para o Zika não podem ser considerados candidatos promissores como futuros antivirais. O composto 1 se destacou em relação aos outros compostos e, portanto, foi selecionado para discriminação do seu possível mecanismo de ação.



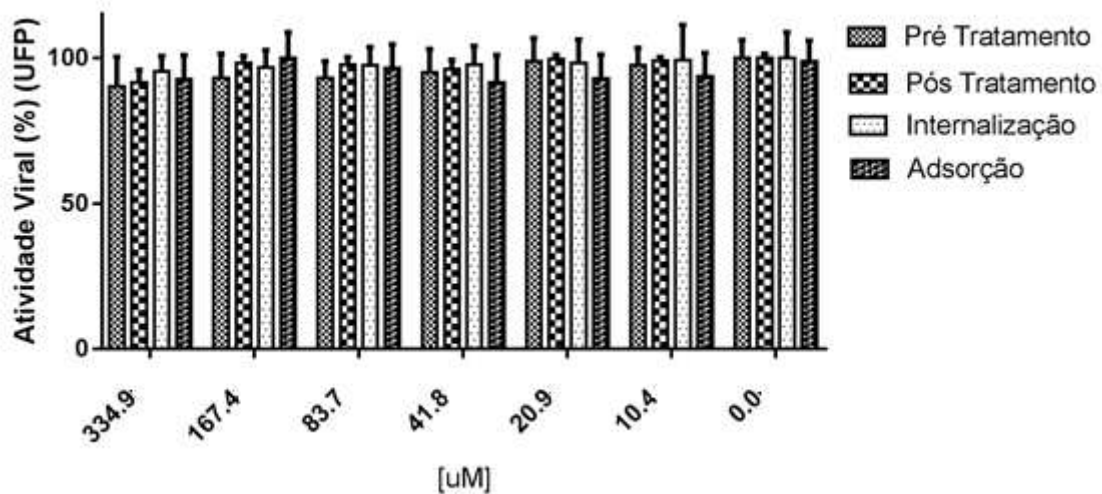


**Figura 1:** Ensaio Virucida. Neste ensaio, células Vero foram submetidas a uma solução contendo 200 UFP de Zika, misturado com volumes iguais das diferentes diluições seriadas dos compostos testados começando com os valores de  $CC_{50}$ , incubados por 1 hora. Como controle positivo (C +), 200 UFP de Zika foram misturados a volumes iguais de DMEM incompletos. Os resultados do ensaio virucida foram conduzidos com os compostos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

12, 13, e 14 mostrados no gráfico como (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H), (I), (J), (K), e (L) respectivamente. A atividade viral é baseada na formação das placas de lise normalizadas pela porcentagem, considerando o controle positivo como 100%. \*\*\*\*P < 0.0001 vs (C+).

### **5.3 A INTERAÇÃO PRÉVIA COM A PARTÍCULA VIRAL É FUNDAMENTAL PARA UMA SIGNIFICANTE REDUÇÃO DA INFECTIVIDADE DO ZIKA IN VITRO**

O composto 1 foi avaliado quanto ao seu mecanismo de ação envolvido no bloqueio da infecção do Zika in vitro pela redução na formação de placas (Figura 2). Pontos cruciais do ciclo infeccioso como a adsorção e entrada, internalização e as atividades intracelular viral foram avaliadas para discriminar as possíveis estratégias de ação dos derivados 1,2,3 triazólicos da Vanilina em impedir a progressão da infecção pelo ZIKV. Para isso, os ensaios de Pré tratamento, Pós tratamento, Internalização e Adsorção foram realizados. Os resultados demonstram que o composto 1 não foi estatisticamente efetivo na proteção celular e, portanto, não houve redução na infecção viral. O ensaio de pós tratamento portanto foi realizado e apenas a concentração máxima não citotóxica do composto 1 foi responsável por diminuir a atividade viral em pelo menos 10%, ainda que estatisticamente significativo, esse não é o mecanismo de ação principal do composto 1 mas certamente está envolvido no seu espectro de ação. O ensaio de adsorção em que as células são previamente refrigeradas a 4°C para impedir a internalização e possibilitar a adsorção foi realizado e uma solução contendo 200 UFP de Zika sem tratamento prévio e uma solução contendo as diferentes soluções seriadas do composto 1 foram submetidas as células refrigeradas. Para o ensaio de internalização as células foram refrigeradas e colocadas em contato com uma solução de 100 UFP de Zika para adsorção e bloqueio da internalização, após um tempo essa solução foi removida e diferentes soluções do composto 1 foram submetidas a estas células por 1 hora a 37°C para avaliar se estas concentrações impedem a internalização viral. O composto 1 não foi estatisticamente efetivo na redução da infecção do Zika pelos mecanismos de adsorção sem tratamento prévio e internalização.

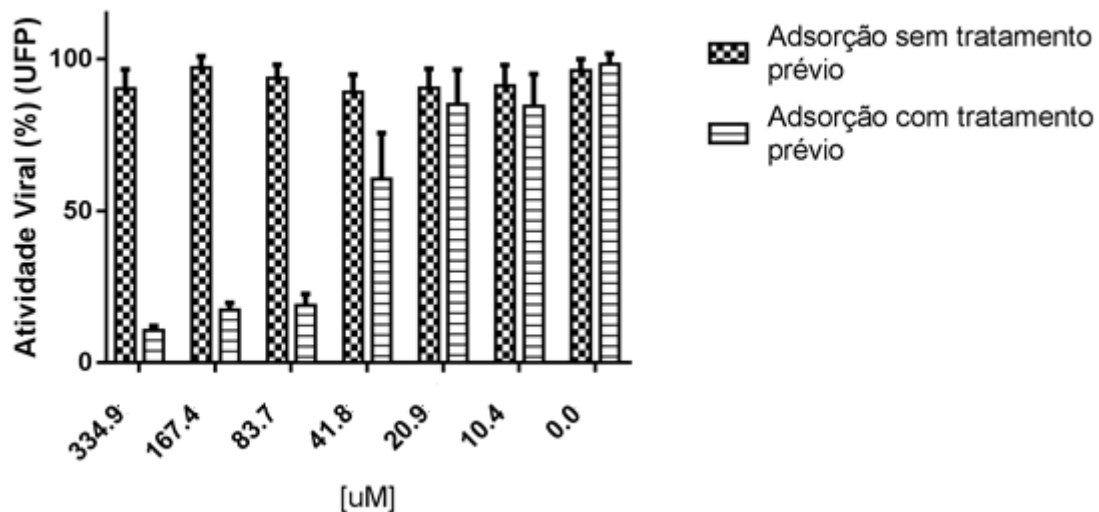


**Figura 2:** Discriminação da estratégia de ação do composto 1. A atividade viral foi mensurada em diferentes estágio e condições da infecção pela presença ou ausência da formação de placas de lise. A atividade viral foi baseada na formação das placas de lise normalizada pela porcentagem considerando ( C +) como 100%.  $P < 0.0001$  vc ( C +).

#### 5.4 O EFEITO VIRUCIDA SOBRE A PARTÍCULA VIRAL BLOQUEIA OS MECANISMOS INICIAIS DE ENTRADA E IMPEDE A CONTINUIDADE DO CICLO INFECCIOSO DO ZIKA

A partícula viral infecciosa inicia seu processo de infecção pelo reconhecimento dos fatores de ligação e receptores de entrada presentes nas células do hospedeiro. O composto 1 parece estar envolvido na interação com a partícula viral perturbando o envelope viral ou mantendo interação com a proteína E do envelope de Zika, impedindo seu papel no reconhecimento dos fatores de ligação e receptores de entrada diminuindo a infectividade do Zika. Um experimento de adsorção em que uma suspensão de Zika foi previamente tratada foi performado e diferentemente do ensaio de adsorção sem tratamento prévio, a atividade viral foi estatisticamente reduzida, com resultados bem semelhantes àqueles apresentados no ensaio virucida (Figura 3). No ensaio de adsorção previamente tratado a redução da infectividade viral foi evidenciada até mesmo na concentração de 10.4  $\mu\text{M}$ , o que não foi observado no ensaio virucida. Uma combinação das estratégias de bloqueio dos mecanismos iniciais de entrada e eventos intracelulares do Zika, este último evidenciado pelo ensaio de pós tratamento, parecem

ser os mecanismos pelos quais o composto 1 age para impedir a continuidade do ciclo infeccioso do Zika.

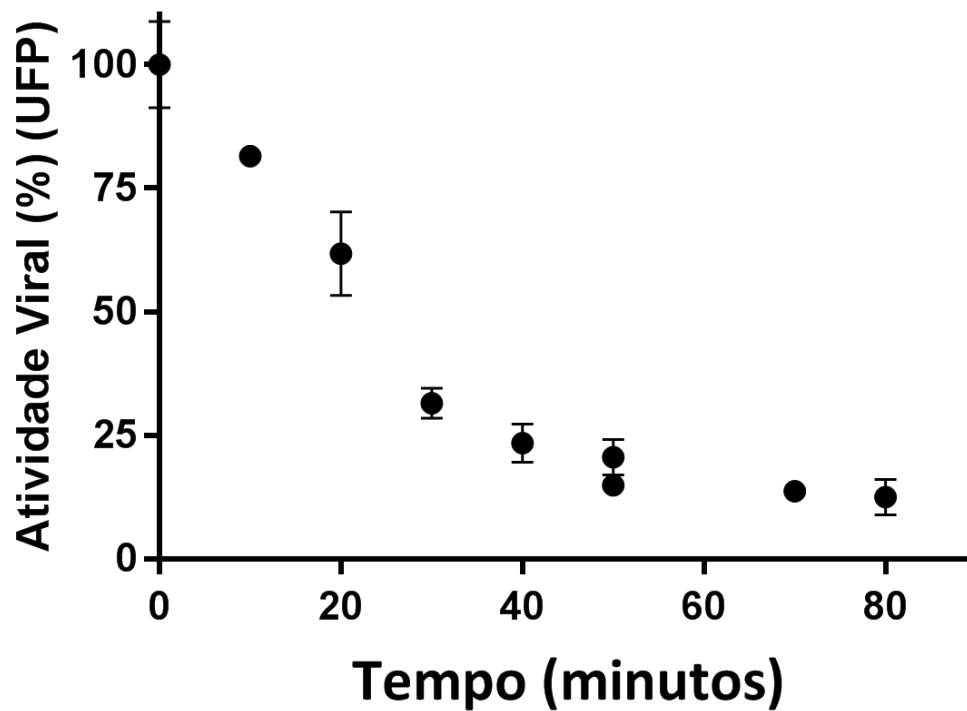


**Figura 3:** Efeito virucida sobre a partícula viral e bloqueio dos mecanismos iniciais de entrada. A atividade viral foi mensurada pela presença ou ausência da formação de placas de lise nas condições iniciais de entrada da infecção, pela adsorção sem e com tratamento prévio. A atividade viral foi baseada na formação das placas de lise normalizada pela porcentagem considerando (C+) como 100%.  $P < 0.0001$  vc (C+).

### 5.5 A INTERAÇÃO COM A PARTÍCULA VIRAL E A REDUÇÃO DA ATIVIDADE DO ZIKA É TEMPO DEPENDENTE

Para saber se o tempo de contato do composto 1 com a partícula viral exerce alguma influência sobre a redução da atividade viral, um ensaio virucida tempo dependente foi performado (Figura 4). Uma solução contendo 200 UFP de Zika foi tratada com a maior concentração do composto 1 obtida pelo  $CC^{50}$ , em diferentes tempos (0,10,20,30,40,50,60,70,80 minutos). A partir dos 10 minutos em contato com a partícula viral o composto 1 demonstrou uma interação estatisticamente significativa avaliada pela redução da

atividade viral. A partir dos 30 minutos mais de 50% da atividade viral foi estatisticamente reduzida. Estes resultados indicam que o principal mecanismo pelo qual o composto 1 tem como estratégia de ação é sobre a partícula viral e que essa ação é tempo dependente e pode estar associado a perturbação do envelope viral ou interação com a proteína E do envelope.

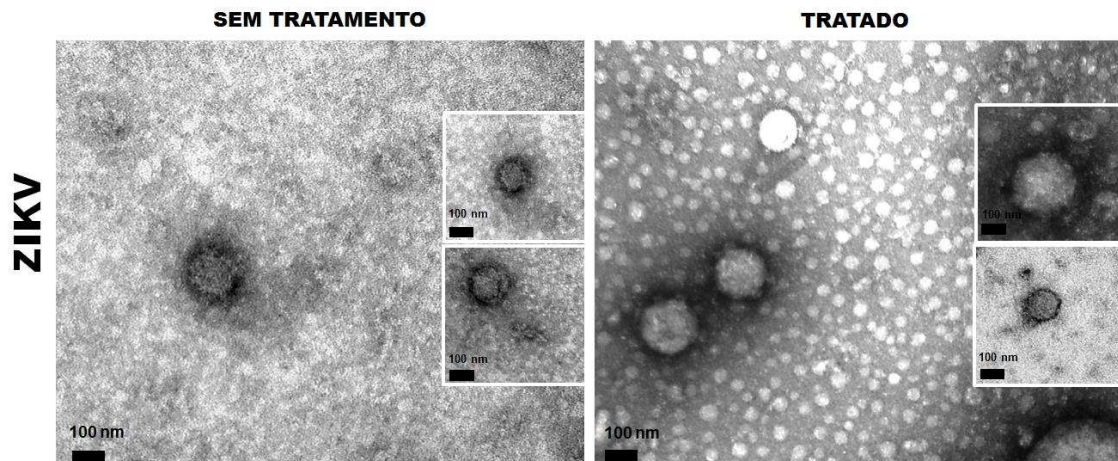


**Figura 4:** Efeito virucida tempo dependente do composto 1. A atividade viral foi mensurada pela presença ou ausência da formação de placas de lise nos diferentes tempos (0,10,20,30,40,50,60,70,80 min) em que a partícula viral foi tratada com a concentração de 334.9  $\mu$ M do composto 1. A atividade viral foi baseada na formação das placas de lise normalizada pela porcentagem considerando (C+) como 100%.  $P < 0.0001$  vc (C+).

## 5.6 A AÇÃO VIRUCIDA SOBRE A PARTÍCULA DE ZIKA NÃO INDUZ PERTURBAÇÃO APARENTE NO ENVELOPE VIRAL

Para saber se o mecanismo virucida do composto 1 pode estar perturbando o envelope viral e assim inibindo a infecção do Zika, uma análise de microscopia eletrônica foi realizada (Figura 5). Soluções contendo vírus tratado com composto um por uma hora e vírus sem tratamento foram preparadas para análise de microscopia eletrônica. Aparentemente a interação

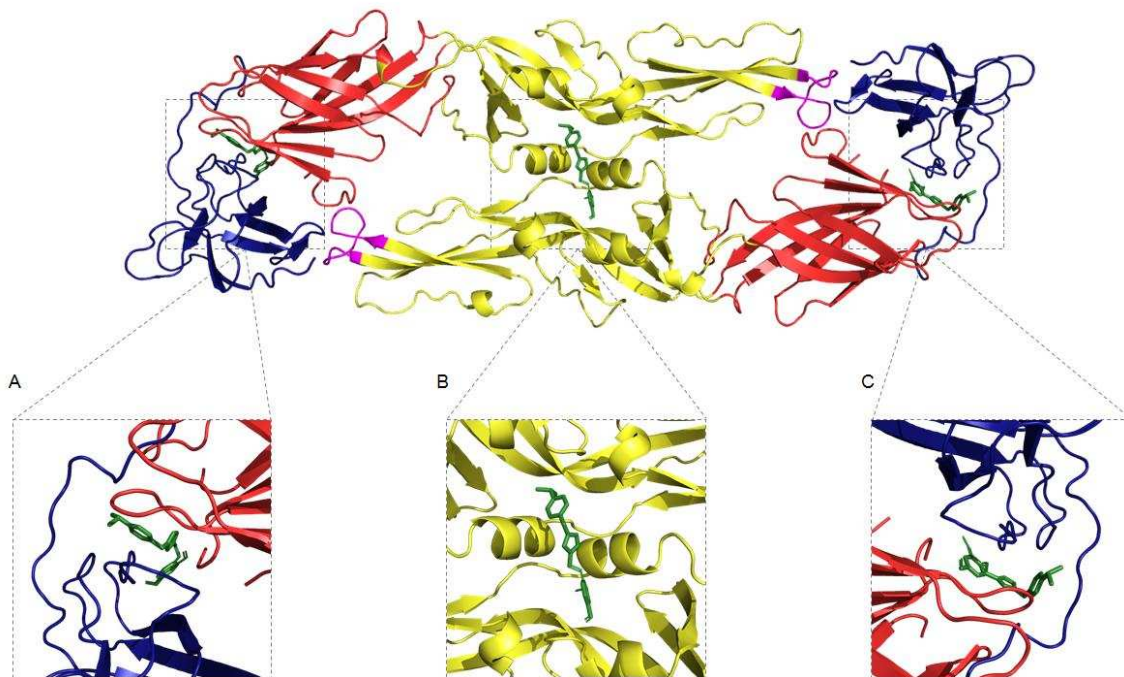
com a partícula viral não está associada à perturbação do envelope viral uma vez que não houve alteração da morfologia do vírus tratado com o vírus sem tratamento. Isto indica que a interação pode estar acontecendo de forma sutil em que não há perturbação evidente e ou essa interação é com as proteínas virais presentes no envelope, mais precisamente a proteína E, devido ao seu papel fundamental para entrada na célula do hospedeiro.



**Figura 5:** Microscopia Eletrônica de partículas do ZIKA com e sem tratamento com o composto 1.

### 5.7 SIMULAÇÃO DE DOCKING MOLECULAR INDICA INTERAÇÃO EM SÍTIOS ESTRATÉGICOS DA PROTEÍNA E DO ENVELOPE DE ZIKA

Uma análise de docking molecular foi realizada para saber se o composto 1 possui interação com a proteína E do envelope de Zika (Figura 6). O composto 1 promove sítios de interação entre DI (vermelho) e DIII (azul), essas regiões são cruciais para a mobilidade da proteína E. Uma interação também é mostrada na região central entre o domínio II (amarelo). Nesta região se localiza o peptídeo fusão, responsável pela fusão das membranas viral e endossomal. Ao que tudo indica a interação nestes locais pode estar diminuindo a infectividade do Zika, uma vez que a proteína E, mais especificamente o DIII da proteína está envolvido no reconhecimento dos fatores e receptores de ligação para entrada do vírus na célula.



**Figura 6:** Docking Molecular da interação do composto 1 com a proteína E do envelope de Zika (PDB código 5JHM). Visão geral da proteína mostrando a interação do composto 1 (ligante verde) com as regiões da extremidade ( A e C) e central (B) usadas na análise in silico ( DI: vermelho; DII: amarelo; DIII: azul).

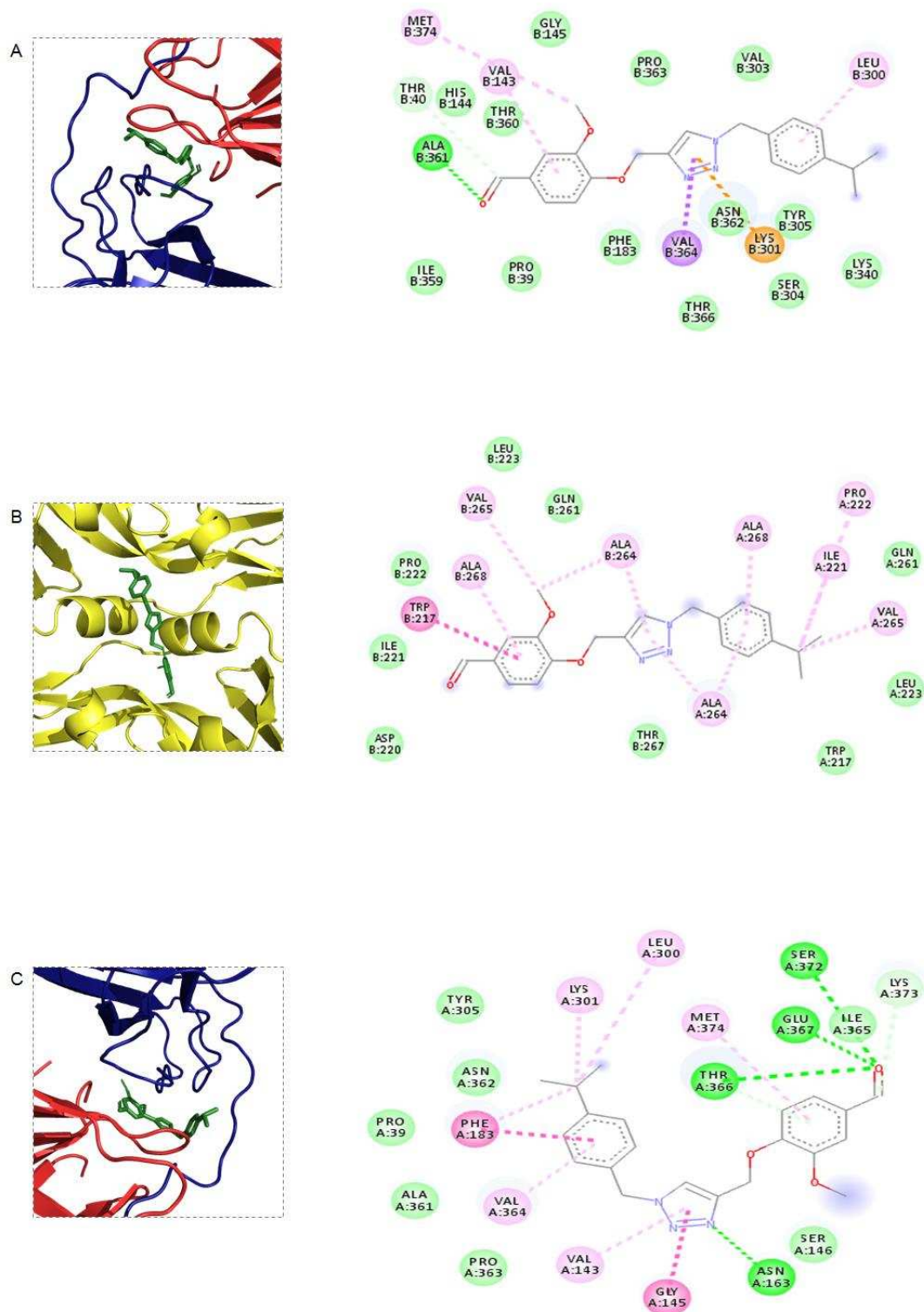
### **5.8 A ENERGIA FAVORÁVEL DE INTERAÇÃO ENTRE AS REGIÕES DA EXTREMIDADE E CENTRAL DA PROTEÍNA E DO ZIKA É DEVIDO ÀS INTERAÇÕES COM RESÍDUOS ESTRATÉGICOS PRESENTES NOS DOMÍNIOS I, II e III.**

Docking local nas regiões da extremidade e central da proteína E do Zika mostraram alta afinidade do composto 1 com essas regiões como é mostrado na Tabela 2. O sítio 1 apresenta 7 interações moleculares entre os aminoácidos destas regiões com o composto 1, esse sítio se localiza entre as regiões de DI e DIII da proteína E. A pontuação da interação nesta região indica alta afinidade com um valor de -8.1 kcal/mol. O sítio 2 também apresenta 7 interações moleculares bem semelhantes aos do sítio 1 e também se localiza entre DI e DIII. A energia de interação com os resíduos de aminoácidos nesta região apresenta um valor de -8.3 kcal/mol, indicando uma interação favorável do composto 1 nesta região. Além da interação com as extremidades da proteína E e seus domínios DI e DIII, o composto 1 também mostrou promover interações favoráveis com a região central da proteína E entre o DII, apresentando

uma energia de -7.2 kcal/mol. Como pode ser visto na Tabela 2 e na Figura 7, o composto 1 promove interações com resíduos de aminoácidos importantes para a flexibilidade da proteína E. No sítio 1, o resíduo ALA 361 está interagindo por meio de uma ligação de hidrogênio convencional com o grupo aldeído do composto 1. Ainda promovendo interação com a parte da vanilina presente no composto 1, os resíduos THR 40. Já os resíduos VAL 143 e MET 374, estão interagindo com os grupos fenol e éter por meio de interações de van der Waals e Alquil. Interagindo com os núcleos 1,2,3 triazólicos da molécula por meio de interações Pi-sigma, Pi-cation e hidrogênio-carbono, os resíduos VAL 364 e LYS 301 e o resíduo LEU 300 promovendo interações Pi-alkil e de hidrogênio-carbono com o grupo isopropil da molécula (Figura 7 A). O sítio 2, os resíduos de SER 372, GLU 367, THR 366 e LYS 373 interagem com o grupo aldeído do composto 1 por meio de ligações de hidrogênio convencional e de van der Waals. Interagindo com o núcleo triazol os resíduos ASN 163, GLY 145, VAL 143 por meio de ligações de hidrogênio convencional, PiPi e empilhamento de Amida-Pi. Ligações de hidrogênio carbono, Pi-alkil, alkil, Pi-Pi e empilhamento de Amida-Pi são apresentadas entre os aminoácidos VAL 364, PHE 183, LYS 301 e LEU 300 (Figura 7 C). Entre o DII definindo a região central, os resíduos TRP 217 e ALA 268 perfazem interações de van der Waals, Pi-Pi e Alquil com o grupo fenol e os resíduos VAL 265, ALA 264 com o grupo éter da molécula de vanilina, enquanto que ALA 264 perfaz interações de van der Waals e alkil com o núcleo 1,2,3 triazol e os resíduos ALA 264, ALA 268, ILE 221, VAL 265 e PRO 222 interagem com o grupo isopropil benzil presentes no composto 1 (Figura 7 B). Todos esses resíduos estão presentes em regiões de flexibilização da proteína E.

Tabela 2 : Ligações previstas entre a proteína E do ZIKA e o composto 1

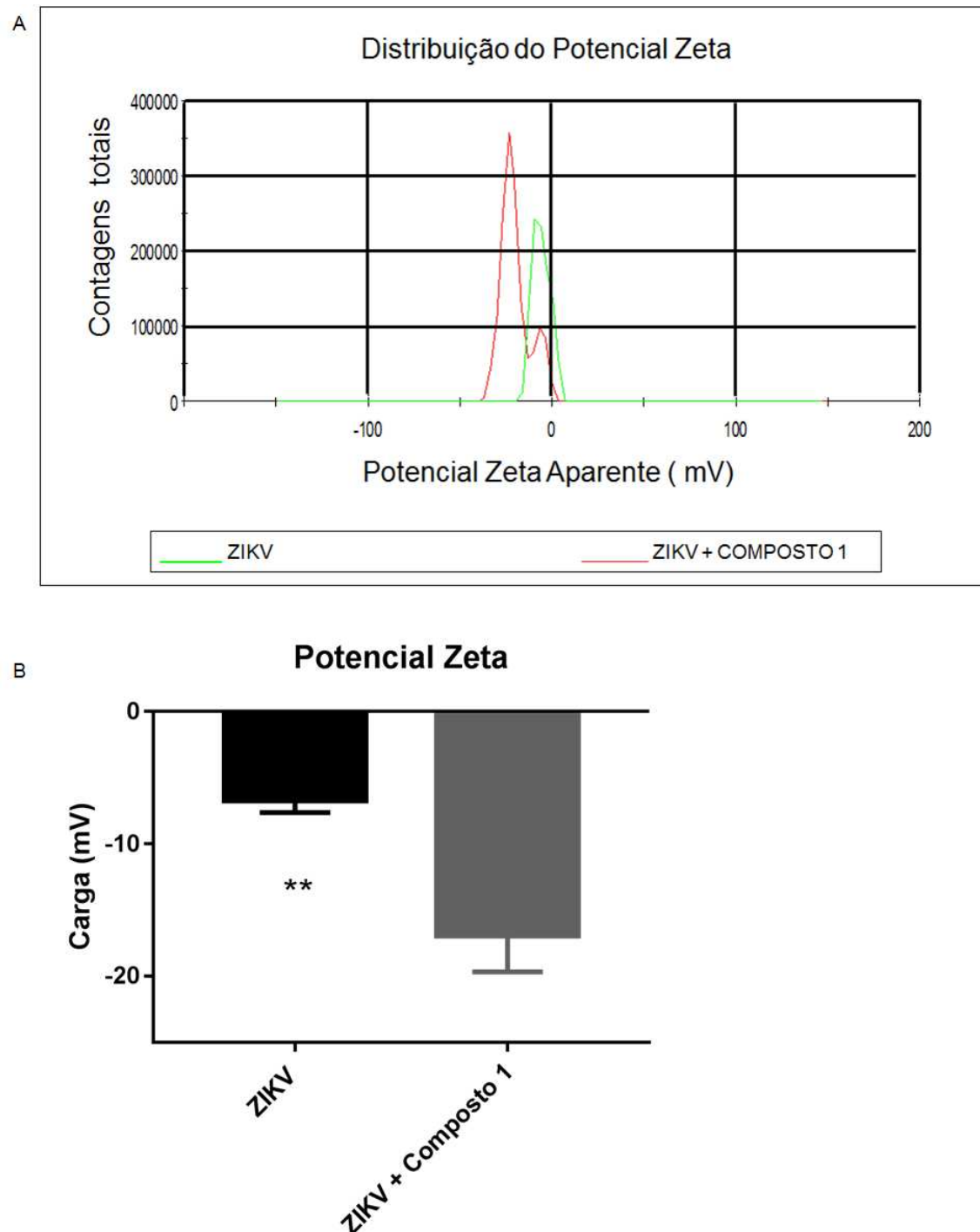
Alvo (Código PDB)	Ligação	Aminoácido	Energia (Pontuação)
	Tipo de ligação		
Extremidade 1 da proteína E de Zika (5JHM)	Van der Waals Ligação de hidrogênio convencional Ligação de Hidrogênio-Carbono Interação Pi-cation Pi-Sigma Alquil Pi-Alquil	THR 40; ALA 361; VAL 143; MET 374; VAL 364; LYS 301; LEU 300	-8.1 kcal/mol
Extremidade 2 da proteína E de Zika (5JHM)	Van der Waals Ligação de hidrogênio convencional Ligação de Hidrogênio-Carbono Interação Pi-Pi em forma de T Empilhamento de Amida-Pi Alquil Pi-Alquil	LEU 300; LYS 301; PHE 183; VAL 364; VAL 143; GLY 145; ASN 163; MET 374; THR 366; GLU 367; SER 372; LYS 373	-8.3 kcal/mol
Região central da proteína E de Zika (5JHM)	Van der waals Empilhamento de PiPi Alquil Pi-Alquil	TRP 217; ALA 268; VAL 265; ALA 264; ALA 268; PRO 222; VAL 265	-7.2 kcal/mol



**Figura 7:** Diagrama de Ligação entre o composto 1 e a proteína E do ZIKA (PDB código 5JHM). Sitio 1 ( A ), Central ( B ), Sitio 2 ( C ).

## 5.9 A REDUÇÃO NA CARGA DAS PARTÍCULAS DE ZIKA TRATADAS CONFIRMAM A INTERAÇÃO COM O COMPOSTO TESTE

A medida do Potencial Zeta (Figura 8) mostrou uma redução na carga do ZIKA tratado com o composto 1 (-17 mV) quando comparado com o ZIKA sem tratamento (-7 mV) (A), isso confirma uma interação estatisticamente significativa entre o composto 1 e a partícula viral de ZIKA (B).



**Figura 8:** Medida do Potencial Zeta. (A) Distribuição do potencial Zeta; (B) Significância estatística do Potencial Zeta. Partículas virais dispersas em água ultra pura e sem tratamento; e ZIKA tratado com o composto 1 por uma hora a 37°C e posterior mensuração. \*\* P < 0,05.

## 6 DISCUSSÃO

A busca por moléculas antivirais contra o vírus da Zika emergiu desde os surtos da Polinésia Francesa e das Américas, uma vez que ficou comprovado a estreita relação entre as manifestações de microcefalia em neonatos e a Síndrome de Guillain Barré em adultos com as infecções pelo Zika (Silva, Santos et al. 2020). Este trabalho avaliou a atividade antiviral de doze compostos 1,2,3 triazólicos derivados da vanilina contra o vírus da Zika, baseado no amplo espectro de atividades da vanilina e no potencial farmacêutico dos núcleos triazólicos.

Inúmeras atividades biológicas da vanilina são relatadas, como por exemplo seu efeito antioxidante, antiapoptótico, anti-inflamatório, neuroprotetor, anticâncer, cardioprotetor e antiviral (Bezerra, Soares et al. 2016, Dhanalakshmi, Janakiraman et al. 2016, Hariono, Abdullah et al. 2016, Bezerra-Filho, Barboza et al. 2019). Hariono *et al.*, demonstraram que derivados da vanilina promovem interação significativa no bloqueio da neuraminidase do vírus H1N1 performado por docking molecular e confirmado por avaliação *in vitro*, apresentando interessantes índices de seletividade (Hariono, Abdullah et al. 2016).

A vanilina é um aldeído aromático que pode ser obtido através da extração das vagens de baunilha, entretanto sua maior obtenção se concentra na síntese em escala industrial usando por exemplo o eugenol como fonte primária, devido suas semelhanças químicas. Estudos conduzidos por Oliveira *et al.*, demonstraram que derivados triazólicos do eugenol são fortes candidatos como potenciais antivirais por sua atividade de inibição da protease do Vírus da Encefalite Janonesa (WNV). A avaliação *in vitro* mostrou baixa citotoxicidade do derivado triazólico do eugenol e atividade inibitória da protease NS2B-NS3 de WNV com uma dose resposta significativa a uma concentração de  $6,86 \mu \text{mol L}^{-1}$ , e essa atividade parece estar associada a interação com os resíduos HIS 51, THR 134, SER 135 e TYR 161, demonstrado por docking molecular (de Oliveira, Gazolla et al. 2019).

Neste trabalho, doze derivados triazólicos da vanilina foram sintetizados e avaliados quanto seu potencial atividade antiviral contra o Zika, bem como seus mecanismos de ação. Todos os compostos avaliados apresentaram valores de  $CC_{50}$  acima de  $200 \mu\text{M}$  e, portanto, baixa citotoxicidade, ao passo que doze desses compostos foram avaliados quanto sua atividade antiviral sobre as partículas infecciosas de Zika resultando em valores de concentração efetiva  $CE_{50}$  significativos para a maioria. A combinação dos valores de  $CC_{50}$  e  $CE_{50}$  revelaram índices de seletividade consideráveis para 8 compostos com destaque para o composto 1 com valores de  $CC_{50}$ ,  $CE_{50}$  e IS de  $334.9 \mu\text{M}$ ,  $27,14 \mu\text{M}$  e 12.3 respectivamente. Valores de citotoxicidade

semelhantes aos encontrados neste trabalho são mostrados por Poly da Silva *et al.*, que dos 31 compostos derivados das xantenadionas avaliados contra Zika, 26 apresentaram valores de  $CC_{50}$  acima de  $200\mu\text{M}$ , e não apresentaram qualquer efeito citotóxico sobre células Vero (Poly da Silva, Lopes da Silva et al. 2020).

A capacidade de inibição da infecção pelo Zika *in vitro* após interação prévia com a partícula viral indica uma atividade virucida de nove compostos de doze testados no presente trabalho. O composto 1, foi selecionado para análises posteriores afim de elucidar seus possíveis mecanismos de ação uma vez que reduziu a atividade do Zika em 50 % até mesmo em uma concentração de  $41.8\mu\text{M}$ . Aparentemente sua atividade está fortemente associada após interação com a partícula viral ao passo que uma ação sobre algum componente importante para a replicação, processamento da poliproteína, montagem e ou liberação das partículas de Zika pode estar associado no seu potencial em reduzir a atividade viral. O composto 1 não foi capaz de reduzir a atividade viral pelo direcionamento a algum componente das células do hospedeiro, como por exemplo os fatores de ligação ou receptores de entrada, mantendo a atividade do Zika em 100% quando células Vero foram pré tratadas com o composto 1. A internalização também não foi perturbada e atividade do Zika permaneceu em 100%. Curiosamente a maior concentração não citotóxica do composto 1 foi estatisticamente capaz de inibir a atividade do Zika após adsorção e internalização da partícula viral, demonstrado pelo ensaio de pós tratamento. Ainda que essa redução foi de aproximadamente 10%, estes resultados sugerem que o composto 1 pode estar atuando sobre algum componente importante para os mecanismos intracelulares do ciclo infeccioso do Zika. Sugerimos, portanto, que o composto 1 pode estar atuando sobre a protease NS2B-NS3 do Zika, uma vez que Oliveira et al., demonstrou que compostos triazólicos derivados do eugenol inibem a atividade da protease de WNV, um arbovírus que assim como o Zika compõe o gênero *Flavivírus*, e portanto possuem estreita relação e homologia entre seus componentes virais (de Oliveira, Gazolla et al. 2019). Recentemente um estudo de modelagem molecular com derivados da vanilina, sugeriram que estes possuem uma atividade antiviral significativa como inibidores da protease do Sars-COV 2, indicando uma capacidade em combater a COVID-19 (Law, Asaruddin et al. 2020).

Foi observado ainda que a inibição da entrada do Zika só foi possível após interação do composto 1 com a partícula viral. Um polifenol presente em grande quantidade no chá verde conhecido como (-) - Galato de epigallocatequina (EGCG), demonstrou atividade antiviral e consequente inibição da entrada de ZIKV *in vitro*, após interação com a partícula viral, indicando uma atividade virucida sobre o vírus da Zika. Sua concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) foi de

aproximadamente 21,4  $\mu\text{M}$ , valor bem semelhante ao encontrado neste trabalho para o composto 1 com  $\text{CE}_{50}$  DE 27,14  $\mu\text{M}$  (Carneiro, Batista et al. 2016).

A ação virucida sobre a partícula viral e consequente redução da atividade viral pode estar associado a uma perturbação da estrutura do vírus, no caso do Zika, um vírus envelopado essa perturbação ocorreria no envelope viral. Uma análise de microscopia eletrônica mostrou que o composto 1 não causa perturbação aparente no envelope do Zika após tratamento prévio. Os resultados sugerem, portanto, que o composto 1 pode estar interagindo com algum componente do envelope importante para entrada viral, como é o caso da proteína E do envelope. Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho Neris et al., demonstraram que derivados da porfirina, uma classe de moléculas heterocíclicas orgânicas naturais ou sintéticas alteram a integridade dos envelopes de arbovírus, incluindo Zika, perceptível após análises de microscopia eletrônica (Neris, Figueiredo et al. 2018). Ainda que não perceptível em microscopia eletrônica, o composto 1 poderia estar perturbando a integridade do envelope viral e devido a este fato uma análise mais minuciosa deve ser colocada em prática, como por exemplo uma análise de microscopia de força atômica. Monteiro et al., através de análises de microscopia de força atômica demonstraram que o peptídeo antimicrobiano HS-1 inibe a infecção pelo vírus da dengue, e que seu efeito virucida induz invaginações no envelope viral e consequente redução na partícula viral (Monteiro, Oliveira et al. 2018).

A atividade virucida do composto 1 pode também estar associado a uma interação com a proteína E do envelope de Zika, de forma que impeça a atividade da proteína E em promover a entrada da partícula viral. Uma análise de docking molecular foi performada e revelou que o composto 1 possui uma pontuação favorável de interação com a proteína E, nas suas regiões da extremidade, denominadas sitio 1 e sitio 2 e na sua região central, cerca de -8,1, -8,3 e -7.2 kcal/mol, respectivamente. A análise do diagrama dessa interação revela ainda que essa pontuação favorável está associada a interação com do composto 1 com resíduos de aminoácidos entre os domínios I e II da proteína E, envolvidos na flexibilidade da proteína como, além de uma interação entre o DII estabilizando a região central e as extremidades. Atualmente é bem estabelecido que os virions de Zika não são estruturas estáticas e sua mobilidade aumenta a infecção viral, pela exposição transitória de sítios presentes na proteína E, envolvidos em reconhecimento efetivo dos fatores e receptores de ligação. A proteína E do envelope pode mediar a ligação do vírus ao receptor de entrada pela exposição do peptídeo de fusão em pH neutro, e consequentemente aumentando a infectividade viral. O domínio III da

proteína E de Zika é o principal determinante antigênico pela presença do sítio de ligação ao receptor (Agreli, de Moura et al. 2019).

Uma análise de docking molecular demonstrou que o composto Epigallocatequina Galato (EGCG), promove uma interação na extremidade da proteína E, entre os domínios I e III, mais especificamente em torno do ligante flexível que une os dois domínios, entre resíduos DI 1, 13, 34-40, 143-146, 163, 183 e DIII como 340-345, 354-358, 360-367, 372-375, 378, 388, 390-392 e 395 (Sharma, Murali et al. 2017). Da mesma forma nossos resultados demonstraram que o composto 1 mantém interações com resíduos de aminoácidos presentes entre DI e DIII, também em torno de regiões flexíveis da proteína E presentes entre esses domínios, promovendo uma estabilização e aumento da mobilização da proteína E. Além da interação entre DI e DIII nossos resultados indicam uma interação entre o composto 1 e a região central da proteína E entre o DII, aumentando ainda mais a estabilização da proteína E, diminuindo a entrada do Zika nas células. Semelhante aos nossos resultados Polly da Silva *et al.*, demonstrou através de análise *in silico* que um derivado das xantenadionas se liga na região central da proteína E, entre o DII e mantém interação com o resíduo de triptofano 217, sendo possivelmente o mecanismo pelo qual o composto atua na inibição da infecção do Zika (Poly da Silva, Lopes da Silva et al. 2020). Curiosamente os nossos resultados de docking local na região central, demonstraram uma interação do composto 1 com o resíduo triptofano 217. Estes achados corroboram nossa hipótese de que o efeito virucida sobre a partícula viral parece estar associada com a interação e consequente estabilização da proteína E do envelope de Zika.

A ação virucida do composto 1 e sua possível interação com a proteína E presente na partícula viral de Zika, foi ainda confirmada pelas medidas das cargas de interação entre o composto 1 e a partícula viral, possível pela análise do Potencial Zeta. Nossos resultados demonstram um aumento estatisticamente significativo na carga negativa das partículas de Zika tratadas com o composto 1.

A partir destes resultados podemos concluir que derivados triazólicos da vanilina podem ser candidatos promissores como agentes antivirais contra a infecção pelo Zika vírus. Estudos mais detalhados dos seus mecanismos de ação devem ser realizados, afim de garantir sua aprovação para testes clínicos.

## 7 CONCLUSÕES

Neste presente trabalho, 15 compostos derivados triazólicos da vanilina foram sintetizados e 12 foram avaliados quanto seu potencial em reduzir a atividade viral do ZIKV *in vitro*. Uma atividade antiviral estatisticamente significativa foi apresentada por 9 desses 12. O composto 1 denominado 4-((1-(4-isopropilbenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído foi considerado o mais promissor sendo capaz de diminuir a infectividade do ZIKV, através da sua interação com a partícula viral. Este composto parece estar promovendo uma interação com a proteína do envelope viral, mais especificamente com a proteína E de ZIKV, impedindo sua ação na promoção da entrada nas células do hospedeiro. Estudos mais conclusivos são necessários, principalmente os envolvidos na avaliação da proteção *in vivo*, entretanto, a partir desses resultados sugerimos que derivados da vanilina funcionalizados com núcleos triazólicos e grupos funcionais podem se tornar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de medicamentos antivirais contra o ZIKV.

## 8 REFERÊNCIAS

- Agrelli, A., R. R. de Moura, S. Crovella and L. A. C. Brandao (2019). "ZIKA virus entry mechanisms in human cells." Infect Genet Evol **69**: 22-29.
- Bernatchez, J. A., L. T. Tran, J. Li, Y. Luan, J. L. Siqueira-Neto and R. Li (2020). "Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection." J Med Chem **63**(2): 470-489.
- Best, S. M. (2016). "Flaviviruses." Curr Biol **26**(24): R1258-R1260.
- Bezerra-Filho, C. S. M., J. N. Barboza, M. T. S. Souza, P. Sabry, N. S. M. Ismail and D. P. de Sousa (2019). "Therapeutic Potential of Vanillin and its Main Metabolites to Regulate the Inflammatory Response and Oxidative Stress." Mini Rev Med Chem **19**(20): 1681-1693.
- Bezerra, D. P., A. K. Soares and D. P. de Sousa (2016). "Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development." Oxid Med Cell Longev **2016**: 9734816.
- Carneiro, B. M., M. N. Batista, A. C. S. Braga, M. L. Nogueira and P. Rahal (2016). "The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry." Virology **496**: 215-218.
- da Silva, S., D. Oliveira Silva Martins and A. C. G. Jardim (2018). "A Review of the Ongoing Research on Zika Virus Treatment." Viruses **10**(5).
- de Oliveira, A. S., P. A. R. Gazolla, A. Oliveira, W. L. Pereira, S. V. L. C. de, A. Maia, E. G. Santos, I. E. P. da Silva, T. A. O. Mendes, A. M. da Silva, R. S. Dias, C. C. da Silva, M. D. Poleto, R. R. Teixeira and S. O. de Paula (2019). "Discovery of novel West Nile Virus protease inhibitor based on isobenzonafuranone and triazolic derivatives of eugenol and indan-1,3-dione scaffolds." PLoS One **14**(9): e0223017.
- Dhanalakshmi, C., U. Janakiraman, T. Manivasagam, A. Justin Thenmozhi, M. M. Essa, A. Kalandar, M. A. Khan and G. J. Guillemin (2016). "Vanillin Attenuated Behavioural Impairments, Neurochemical Deficits, Oxidative Stress and Apoptosis Against Rotenone Induced Rat Model of Parkinson's Disease." Neurochem Res **41**(8): 1899-1910.
- Dick, G. W., S. F. Kitchen and A. J. Haddow (1952). "Zika virus. I. Isolations and serological specificity." Trans R Soc Trop Med Hyg **46**(5): 509-520.

Golubeva, V. A., T. C. Nepomuceno, G. Gregoriis, R. D. Mesquita, X. Li, S. Dash, P. P. Garcez, G. Suarez-Kurtz, V. Izumi, J. Koomen, M. A. Carvalho and A. N. A. Monteiro (2020). "Network of Interactions between ZIKA Virus Non-Structural Proteins and Human Host Proteins." Cells **9**(1).

Hariono, M., N. Abdullah, K. V. Damodaran, E. E. Kamarulzaman, N. Mohamed, S. S. Hassan, S. Shamsuddin and H. A. Wahab (2016). "Potential New H1N1 Neuraminidase Inhibitors from Ferulic Acid and Vanillin: Molecular Modelling, Synthesis and in Vitro Assay." Sci Rep **6**: 38692.

Hills, S. L., M. Fischer and L. R. Petersen (2017). "Epidemiology of Zika Virus Infection." J Infect Dis **216**(suppl\_10): S868-S874.

Kazmi, S. S., W. Ali, N. Bibi and F. Nouroz (2020). "A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics." J Biol Res (Thessalon) **27**: 5.

Law, W. Y., M. R. Asaruddin, S. A. Bhawani and S. Mohamad (2020). "Pharmacophore modelling of vanillin derivatives, favipiravir, chloroquine, hydroxychloroquine, monolaurin and tetrodotoxin as M(Pro) inhibitors of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)." BMC Res Notes **13**(1): 527.

Lin, H. H., B. S. Yip, L. M. Huang and S. C. Wu (2018). "Zika virus structural biology and progress in vaccine development." Biotechnol Adv **36**(1): 47-53.

Low, J. G., E. E. Ooi and S. G. Vasudevan (2017). "Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development." J Infect Dis **215**(suppl\_2): S96-S102.

Masmejan, S., D. Musso, M. Vouga, L. Pomar, P. Dashraath, M. Stojanov, A. Panchaud and D. Baud (2020). "Zika Virus." Pathogens **9**(11).

Monteiro, J. M. C., M. D. Oliveira, R. S. Dias, L. Nacif-Marcial, R. N. Feio, S. O. Ferreira, L. L. Oliveira, C. C. Silva and S. O. Paula (2018). "The antimicrobial peptide HS-1 inhibits dengue virus infection." Virology **514**: 79-87.

Neris, R. L. S., C. M. Figueiredo, L. M. Higa, D. F. Araujo, C. A. M. Carvalho, B. R. F. Vercoza, M. O. L. Silva, F. A. Carneiro, A. Tanuri, A. M. O. Gomes, M. T. Bozza, A. T. Da Poian, C. Cruz-Oliveira and I. Assuncao-Miranda (2018). "Co-protoporphyrin IX and Sn-

protoporphyrin IX inactivate Zika, Chikungunya and other arboviruses by targeting the viral envelope." Sci Rep **8**(1): 9805.

Oliveira, A., A. P. M. de Souza, A. S. de Oliveira, M. L. da Silva, F. M. de Oliveira, E. G. Santos, I. E. P. da Silva, R. S. Ferreira, F. S. Villela, F. T. Martins, D. H. S. Leal, B. G. Vaz, R. R. Teixeira and S. O. de Paula (2018). "Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1,3-diones and evaluation of their inhibitory activity against NS2B-NS3 WNV protease." Eur J Med Chem **149**: 98-109.

Paixao, E. S., F. Barreto, G. Teixeira Mda, C. Costa Mda and L. C. Rodrigues (2016). "History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review." Am J Public Health **106**(4): 606-612.

Poly da Silva, I. E., M. Lopes da Silva, R. S. Dias, E. G. Santos, M. C. Brangioni de Paula, A. Silva de Oliveira, A. F. Costa da Silveira Oliveira, F. Marques de Oliveira, C. Canedo da Silva, R. R. Teixeira and S. Oliveira de Paula (2020). "Xanthenedione (and intermediates involved in their synthesis) inhibit Zika virus migration to the central nervous system in murine neonatal models." Microbes Infect **22**(9): 489-499.

Pomar, L., D. Musso, G. Malinger, M. Vouga, A. Panchaud and D. Baud (2019). "Zika virus during pregnancy: From maternal exposure to congenital Zika virus syndrome." Prenat Diagn **39**(6): 420-430.

Saiz, J. C., N. J. Oya, A. B. Blazquez, E. Escribano-Romero and M. A. Martin-Acebes (2018). "Host-Directed Antivirals: A Realistic Alternative to Fight Zika Virus." Viruses **10**(9).

Seeliger, D. and B. L. de Groot (2010). "Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina." J Comput Aided Mol Des **24**(5): 417-422.

Sharma, N., A. Murali, S. K. Singh and R. Giri (2017). "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**(Pt A): 1046-1054.

Sharma, V., M. Sharma, D. Dhull, Y. Sharma, S. Kaushik and S. Kaushik (2020). "Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide." Can J Microbiol **66**(2): 87-98.

Silva, N. M., N. C. Santos and I. C. Martins (2020). "Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines." Trop Med Infect Dis **5**(4).

Teixeira, R. R., P. A. R. Gazolla, A. M. da Silva, M. P. G. Borsodi, B. R. Bergmann, R. S. Ferreira, B. G. Vaz, G. A. Vasconcelos and W. P. Lima (2018). "Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities." Eur J Med Chem **146**: 274-286.