

LUCIANA DE SOUZA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE XANTENODIONAS E SEUS
INTERMEDIÁRIOS TETRACETÔNICOS CONTRA O VÍRUS MAYARO**

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

2020

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

T

F363a
2020
Fernandes, Luciana de Souza, 1994-
Avaliação do potencial antiviral de xantenodionas e seus
intermediários tetracetônicos contra o vírus Mayaro / Luciana de
Souza Fernandes. – Viçosa, MG, 2020.
55 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.43-48.

1. Mayaro vírus. 2. Agentes antivirais. 3. Alphavirus.
4. Compostos bioativos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 579.2562

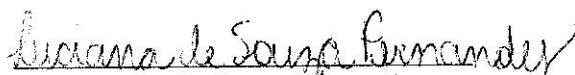
LUCIANA DE SOUZA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE XANTENODIONAS E SEUS
INTERMEDIÁRIOS TETRACETÔNICOS CONTRA O VÍRUS MAYARO**

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: 02 de março de 2020.

Assentimento:


Luciana de Souza Fernandes
Autora


Sérgio Oliveira de Paula
Orientador

Aos meus pais, Luciano e Márcia, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luciano e Márcia, por todo o amor e apoio incondicionais, pela confiança que sempre depositaram em mim, me impulsionando a sempre seguir em frente. Por acreditarem em mim quando eu não acreditei. Por todo o esforço investido em mim, conselhos e ensinamentos, a vocês só posso agradecer e sempre fazer o meu melhor em qualquer desafio.

A minha irmã, Mariana, pelo companheirismo e parceria diários, por sempre me incentivar e me motivar a enfrentar todos os meus desafios, por estar comigo sempre.

A toda minha família, por todo carinho e incentivo.

A minha amiga Carol, pela amizade única e parceria destes últimos anos, que nossa conexão continue por muitos outros anos, seja perto ou longe.

Ao professor Sérgio Oliveira de Paula, meu orientador, pela oportunidade e voto de confiança em trabalhar numa área que não tinha experiência e que me possibilitou aprender tanto e amadurecer na minha formação acadêmica.

A Ginnie, amiga e parceira de trabalho, que divide comigo alegrias, frustrações, dramas e perrengues do dia-a-dia.

A todas as Littles, Bruna, Lívia, Jéssica, Helena, Déborah e Lari, por todos os cafés, lanches, risadas e momentos compartilhados, que tornaram a rotina do dia a dia mais leve e mais alegre.

A todos os colegas de trabalho do LIVM, aprendi e sigo aprendendo com todos diariamente. Especialmente, a Roberto, pela paciência e disposição em sempre ajudar com conselhos e ideias e sendo companhia certa para o cafezinho da tarde.

Ao meu estagiário, Marcel, pela disposição e boa vontade em aprender e me ajudar sempre.

Ao professor Róbson Teixeira, pelas incríveis aulas de química, e sua equipe, por fornecer os compostos essenciais para este trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa, por possibilitar meu crescimento profissional e pessoal. Ao Departamento de Biologia Geral, seus professores e funcionários, pelo suporte.

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

RESUMO

FERNANDES, Luciana de Souza, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2020. **Avaliação do potencial antiviral de xantenodionas e seus intermediários tetracetônicos contra o vírus Mayaro.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

As arboviroses são doenças causadas por vírus que são transmitidos pela picada de artrópodes hematófagos a hospedeiros vertebrados. Essas doenças estão amplamente distribuídas em todo o mundo e representam um grande problema de saúde pública, principalmente em países tropicais como o Brasil, o qual apresenta condições muito favoráveis ao desenvolvimento e propagação de vários arbovírus. O *Mayaro virus* (MAYV) é um membro do gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae*, e é transmitido por mosquitos do gênero *Haemagogus*, como o *H. janthinomys*, além dos gêneros *Aedes* e *Anopheles*. A infecção por MAYV resulta na enfermidade chamada febre do Mayaro e iniciou-se em humanos de forma esporádica e incidental, na medida em que a ocupação antrópica avançou sobre as áreas florestadas. Apesar de não ser letal, já foi verificado que MAYV tem potencial debilitante devido a sua capacidade de causar artralgia. A sintomatologia da doença é semelhante a outras arboviroses, o que pode dificultar o diagnóstico correto. Portanto, a busca por novas moléculas capazes de combater o vírus e não somente os sintomas é uma demanda constante. As xantenodionas (1,8-dioxooctaidroxantonas) são moléculas que apresentam diversas funções biológicas como antifúngica, antibactericida e antitumoral. Nesse estudo, vinte e duas xantenodionas e duas tetracetonas foram avaliadas quanto ao seu potencial antiviral contra MAYV. A triagem antiviral empregou células Vero infectadas para avaliação da viabilidade celular e quantificação pelo método do MTT. Oito compostos (03, 05, 07, 08, 09, 10, 12, 15, 16) mantiveram a viabilidade acima de 50% e foram considerados como potenciais inibidores da infecção viral. Além disso, a concentração efetiva capaz de reduzir a atividade viral em 50% (EC_{50}) para cada composto e também seu Índice de Seletividade (IS) foram avaliados. Os compostos 07 ($EC_{50} = 8,40 \mu M$) e 09 ($EC_{50} = 21,17 \mu M$) tiveram os maiores IS: 10,8 e 15,8, respectivamente, e foram selecionados para testes futuros sobre seu mecanismo de ação. Visto que ainda não há vacinas e nem tratamentos específicos disponíveis para a febre do Mayaro, a busca por novas estratégias terapêuticas para a doença se faz necessária. As xantenodionas podem ser uma classe promissora de moléculas em futuros testes com MAYV e outras arboviroses.

Palavras-chave: Vírus Mayaro. Alfavírus. Antivirais. Xantenodionas.

ABSTRACT

FERNANDES, Luciana de Souza, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2020.
Evaluation of antiviral potential of xanthenediones and its tetraketone intermediates against *Mayaro virus*. Advisor: Sérgio Oliveira de Paula.

Arbovirosis are diseases caused by arthropod-borne viruses widely distributed worldwide. They represent a major public health problem, especially in tropical countries such as Brazil, which has favorable conditions for the development and spread of various arboviruses. *Mayaro virus* (MAYV) belongs to *Togaviridae* family and *Alphavirus* genus, transmitted by *Haemagogus*, *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes. The viral infection in humans results in a febrile illness called Mayaro fever. Once sporadic and incidental, this disease has spreaded over urban areas as anthropic occupation advanced throughout forested areas. Although non-lethal, MAYV can result in a long-term debilitating arthralgia. Symptoms associated to this disease are similar to other febrile illnesses, which may impair correct diagnosis. Therefore, the search for new molecules able to fight the virus and not only the symptoms is a constant demand. Heterocyclic compounds containing a pyranosidic nucleus fused on both sides to cyclohex-2-enones rings are called 1,8-dioxooctahidroxantones or xanthenediones. These molecules have antifungicidal, anti-inflammatory, antibacterial, leishmanicidal and antitumor activity. Twenty-two xanthenedione and two tetraketone compounds were evaluated for their antiviral potential against MAYV. Antiviral screening was performed on virus-infected Vero cells in order to evaluate and quantify cell viability via MTT method. Eight compounds (03, 05, 07, 08, 09, 10, 12, 15, 16) were able to maintain cell viability above 50% and were considered inhibitors of viral infection. Furthermore, the 50% effective concentration (EC_{50}) for each compound and their Selectivity Index were evaluated. Compounds 07 ($EC_{50}=8,40\ \mu M$) and 09 ($EC_{50}=21,17\ \mu M$) had the highest SI values: 10.8 and 15.8, respectively, and were selected for future mechanism assays. Given the absence of vaccines and specific treatments for Mayaro fever, the search for new therapeutic strategies to fight the disease is a constant demand. Xanthenediones may present a promising class of molecules for future testing against MAYV and other arbovirosis.

Keywords: Mayaro Virus. Alphavirus. Antivirals. Xanthenediones.

LISTA DE SIGLAS

BEBV – *Bebaru virus*

C – proteína do capsídeo

CC50 – citotoxicidade

CMC – carboximetilcelulose

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

E1 – proteína do envelope E1

E2 – proteína do envelope E2

E3 – proteína do envelope E3

EC50 – concentração efetiva

ECMV – *Encephalomyocarditis virus*

EIA-ICC – *enzyme immunoassay using infected cultured cells*

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERO – espécies reativas de oxigênio

FC – fixação de complemento

FDA – *Food and Drug Administration*

GETV – *Getah virus*

IgG – Imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IH – inibição de hemaglutinação

IL-2 – *interleukin-2*

IL-6 – *interleukin-6*

IL-7 – *interleukin-7*

IL-9 – *interleukin-9*

IL-13 – *interleukin-13*

INF- γ – *interferon- γ*

IS – índice de seletividade

MCP-1 – monocyte chemoattractant protein-1

MOI – *multiplicity of infection*

MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NTPase – nucleosídeo trifosfatase

ONNV – *O'nyong-nyong virus*

ORF – *open Reading frame*

PFU – *plaque forming unit*

PRNT – *plaque reduction neutralization assay*

RE – retículo endoplasmático

RRV – *Ross River virus*

RT-PCR – *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

SFB – soro fetal bovino

SFV – *Semliki Forest virus*

SGP – *subgenomic promoter*

SIER – sítio interno de entrada do ribossomo

TF – proteína *transframe*

TN – teste de neutralização

TNF- α – *tumor necrosis factor- α*

UNAV – *Una virus*

UTR – *untranslated region*

VEGF – *vascular endothelial growth factor*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1. Epidemiologia	12
1.2. Biologia do vírus Mayaro	16
1.3. Vacinas	24
1.4. Diagnóstico e tratamento	25
1.5. Xantenodionas e tetracetonas	26
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Cultura celular e vírus	30
3.2. Xantenodionas e tetracetonas	31
3.3. Triagem antiviral	32
3.4. Ensaio de inibição viral	33
3.5. Índice de seletividade	34
3.6. Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Triagem antiviral	35
4.2. Citotoxicidade, concentração efetiva e índice de seletividade	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	41
7. PERSPECTIVAS	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO I	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Epidemiologia

O vírus Mayaro (MAYV) pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*. É classificado como um arbovírus, sendo transmitido através da picada de vetores artrópodes como mosquitos e carrapatos. MAYV também é parte do complexo Semliki, um grupo sorológico interno ao gênero *Alphavirus*, que consiste em outros sete vírus: *Chikungunya virus* (CHIKV), *O'nyong-nyong virus* (ONNV), *Ross River virus* (RRV), *Semliki Forest virus* (SFV), *Una virus* (UNAV), *Getah virus* (GETV) e *Bebaru virus* (BEBV). Participantes do complexo Semliki dividem sítios antigênicos, o que gera reatividade cruzada entre as espécies deste grupo (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018).

MAYV mantém-se num ciclo enzoótico, isto é, é transmitido por artrópodes a animais silvestres, utilizando-os como reservatórios. Pássaros, primatas, roedores e marsupiais já foram apontados como os principais reservatórios escolhidos pelo vírus. O mosquito *Haemagogus janthynomis* é considerado o principal vetor de transmissão, recorrente em áreas rurais e florestadas de países tropicais como o Brasil. Este mesmo mosquito é o vetor utilizado pelo vírus da febre amarela. Além deste, MAYV já foi isolado de mosquitos dos gêneros *Culex*, *Mansonia*, *Psophora*, *Sabethes* e *Aedes*. A passagem de MAYV a humanos é considerada acidental, exclusiva a trabalhadores de áreas florestadas endêmicas ao vírus. Porém, há um potencial de emergência já que MAYV também é capaz de se replicar em espécies urbanizadas como *A. egypti* e *A. albopictus* (DE OLIVEIRA MOTA *et al.*, 2015). O ciclo se inicia a partir da picada de um mosquito fêmea em um hospedeiro contaminado. O vírus se replica nas células epiteliais do trato digestivo do vetor e alcança a hemolinfa, que o carrega por todo o organismo até chegar as glândulas salivares. O vírus se replica nas glândulas salivares do mosquito e acumula-se na saliva, sendo injetado na corrente sanguínea no momento da picada em outro hospedeiro (ALONSO-PALOMARES *et al.*, 2019).

O primeiro registro de MAYV ocorreu em 1954, no condado de Mayaro de Trinidad e Tobago, na América Central (Figura 1). Nesse registro cinco casos de febre foram reportados, quatro correspondentes a trabalhadores de área florestada e um a uma residente de área urbana (ANDERSON *et al.*, 1957). No ano seguinte, foram registrados os primeiros casos em território

brasileiro, no estado do Pará, onde seis variantes foram isoladas de 6 trabalhadores rurais durante a epidemia (CAUSEY; MAROJA, 1957).

No Brasil, o vírus é considerado endêmico das regiões Norte e Centro-Oeste, locais de área florestada e com a presença do mosquito *H. janthynomis*, o principal vetor de transmissão, que também está envolvido na transmissão do vírus da febre amarela (Figura 1). Em 1978, outro surto foi registrado, desta vez em Belterra, no estado do Pará. De 72 indivíduos com sintomatologia correspondente a febre do Mayaro, 55 casos foram confirmados (PINHEIRO *et al.*, 1981). Neste estado, mais surtos foram registrados ao longo dos anos, em 1981, 1991 e o mais grave em 2008, na cidade de Santa Barbara, onde 36 indivíduos de um total de 105 possuíam anticorpos IgM contra MAYV (ESPOSITO; FONSECA, 2017). Neste mesmo ano, em Manaus-AM foi detectado IgM contra MAYV em 33 indivíduos apresentando dor de cabeça, mialgia e artralgia e o genoma do vírus isolado de um destes pacientes (MOURÃO *et al.*, 2012).

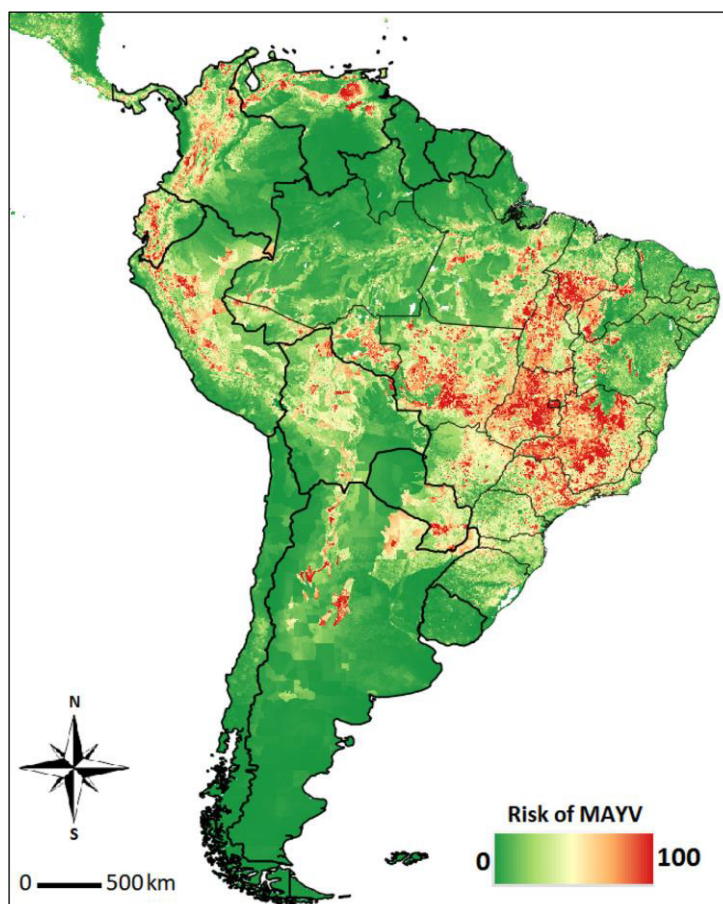


Figura 1 – Mapa de potencial risco atual na América do Sul. As áreas em vermelho representam regiões com condições ambientais com maior risco de aparecimento de casos de MAYV. Adaptado de LORENZ (2019).

O MAYV também teve seu genoma isolado no estado do Acre (TERZIAN *et al.*, 2015). Em Mato Grosso, MAYV foi identificado em mosquitos *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* durante um surto de dengue na cidade de Cuiabá e em 15 de 604 pacientes durante uma investigação molecular da presença de alfavírus em epidemias de dengue (PEREIRA SERRA *et al.*, 2016; ZUCHI *et al.*, 2014).

No estado de Goiás também houve registros da doença, de 75 amostras de soro de 15 confirmaram a presença de anticorpos IgM contra MAYV. Todos os pacientes confirmaram viagens a áreas rurais do estado cerca de 15 dias antes de apresentarem os sintomas (BRUNINI *et al.*, 2017).

Recentemente, MAYV foi identificado no estado do Rio de Janeiro, que ainda não possuía registro da doença. De 57 amostras de resultado indeterminado para o vírus chikungunya comprovou-se a presença de MAYV em três amostras, demonstrando que há circulação deste vírus na região Sudeste (DODERO-ROJAS *et al.*, 2020). De acordo com o boletim epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde, cinco casos de febre do Mayaro foram registrados até a Semana Epidemiológica 35 de 2019. É provável que este número esteja subestimado uma vez que o quadro clínico provocado por MAYV se assemelha a CHIKV e há reatividade cruzada em testes sorológicos. Além disso, a circulação conjunta destes dois vírus, dificulta o diagnóstico diferencial da doença (EPIDEMIOLOGICO, 2019).

Em outros países vários casos também foram registrados durante surtos esporádicos em regiões florestadas pela América Latina e do Sul como México, Haiti, Bolívia, Equador, Peru, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela, todos casos autóctones da doença (Figura 2). Em 1977, casos importados foram registrados na América do Norte, em que indivíduos que viajaram para o Peru e a Bolívia, e ao retornar apresentaram sintomas relacionados a doença. Na Europa, o primeiro caso importado foi confirmado na Holanda, em 2008, em que o paciente havia viajado para o Suriname. Em 2009, mais um caso importado foi confirmado na França após um viajante retornar do Brasil e em 2016, mais um caso importado foi registrado no país (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018).

Em 2010 um dos maiores surtos de infecção por MAYV ocorreu na Venezuela, no qual 77 casos foram reportados e 19 confirmados como soropositivos (AUGUSTE *et al.*, 2015). Inicialmente atribuída apenas à região Amazônica, a febre do Mayaro ao longo dos anos alcançou novas regiões de países do hemisfério Sul e até mesmo alguns países do hemisfério Norte. Seu comportamento epidemiológico se assemelha bastante ao de CHIKV, vírus

pertencente ao mesmo gênero, cujo ciclo adaptou-se rapidamente ao ambiente urbano e espalhou-se por diversos países. O mapa abaixo (Figura 2) apresenta o histórico de casos da febre do Mayaro pelos diferentes países descritos (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018).

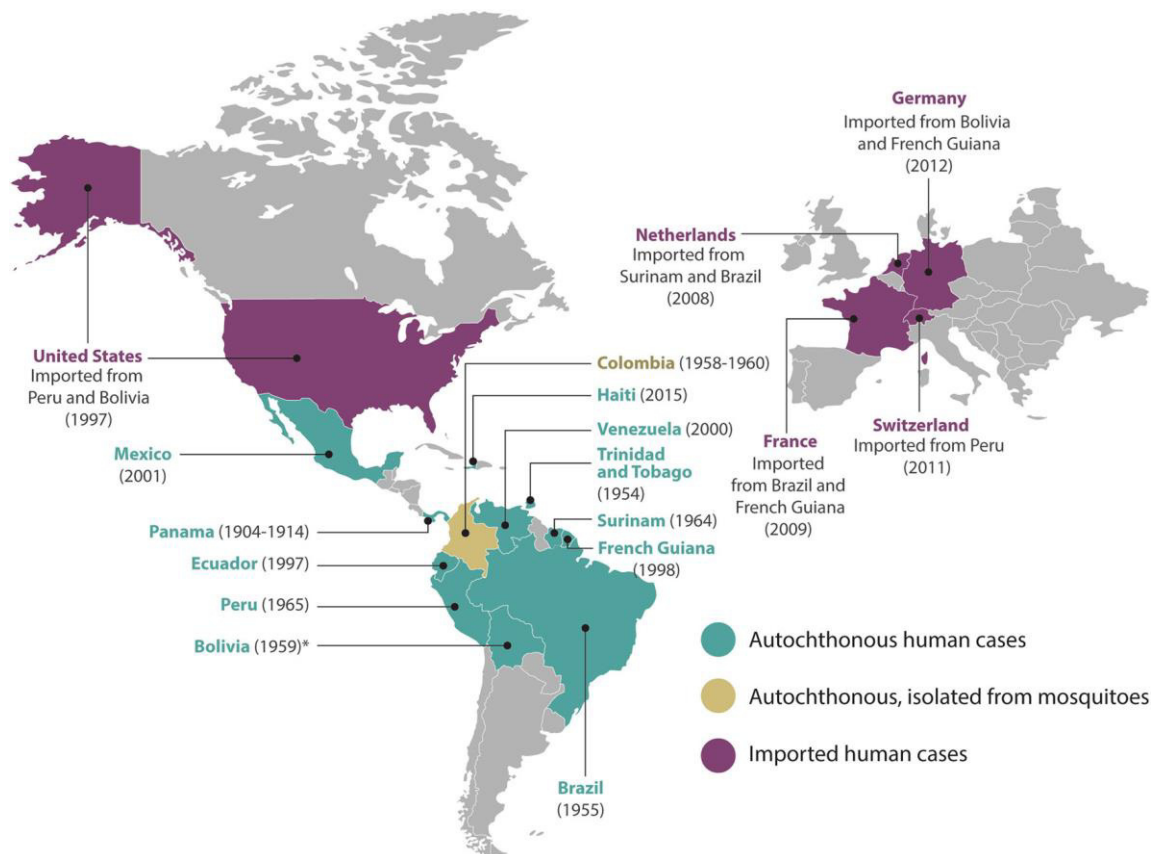


Figura 2 - Distribuição epidemiológica de casos de MAYV pelo mundo. Em verde estão representados os países em que foram registrados casos autóctones em humanos; em amarelo, estão os países em que MAYV foi isolado de mosquitos; e em roxo, estão representados os países com casos importados. Adaptado de ACOSTA-AMPUDIA (2018).

Filogeneticamente, MAYV é dividido em quatro genótipos: D, amplamente disperso, distribuído por Trinidad e Tobago, Brasil, Peru, Bolívia e Venezuela; L (limitado), com apenas quatro isolados no estado do Pará, dois em São Paulo e um isolado no Haiti; N (novo), com um único isolado no Peru; e o mais recentemente identificado, genótipo D/L, híbrido resultante da recombinação dos genótipos D e L. A crescente urbanização e migração entre diferentes áreas do país podem ter contribuído para o surgimento desta nova variante, que resultou na aproximação dos genótipos D e L, geograficamente distantes, e o introduziu em áreas não-endêmicas, como a região Sudeste. Além do Brasil, no Haiti também foi identificado o genótipo

híbrido, resultado do aumento da migração entre os dois países após o terremoto de 2010. Além disso, foi verificado que os eventos de recombinação aumentaram o potencial de adaptação do vírus ao mosquito *A. egypti*, uma espécie urbanizada. Estes resultados complementam estudos anteriores que comprovam a competência vetorial do *A. egypti* na transmissão de MAYV, validando o potencial de emergência e urbanização deste vírus (LONG *et al.*, 2011; MAVIAN *et al.*, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou dois alertas epidemiológicos acerca da febre do Mayaro, em 2010 e 2019, devido a crescente frequência de casos registrados e localidades afetadas pelo mundo, visando o monitoramento da doença junto a outras arboviroses existentes (PAHO/WHO, 2019).

1.2. Biologia do vírus Mayaro

Genoma e proteínas virais

MAYV possui um genoma de RNA fita simples de polaridade positiva de aproximadamente 11,5 kb, que contém duas *open reading frames* (ORFs). A ORF próxima ao terminal 5' codifica uma poliproteína não-estrutural, que passa por uma clivagem proteolítica, originando 4 proteínas não-estruturais: nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. A ORF próxima ao terminal 3' codifica uma poliproteína estrutural, a partir do RNA subgenômico 26S (mRNA 26S). Esta poliproteína passa por um processamento via autocatálise e proteases celulares, e dá origem a seis proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope (E1, E2 e E3), 6k e *transframe* (TF). As duas ORFs são flanqueadas por duas regiões não-traduzidas (UTRs), contendo ainda uma região para *cap* no terminal 5' e uma cauda poliadenilada no terminal 3'. Além disso, a junção entre as duas ORFs contém um sítio interno de entrada de ribossomo (SIER) e um promotor subgenômico (SGP) (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018; MACKAY; ARDEN, 2016). A representação da organização genômica de MAYV está ilustrada na Figura 3.

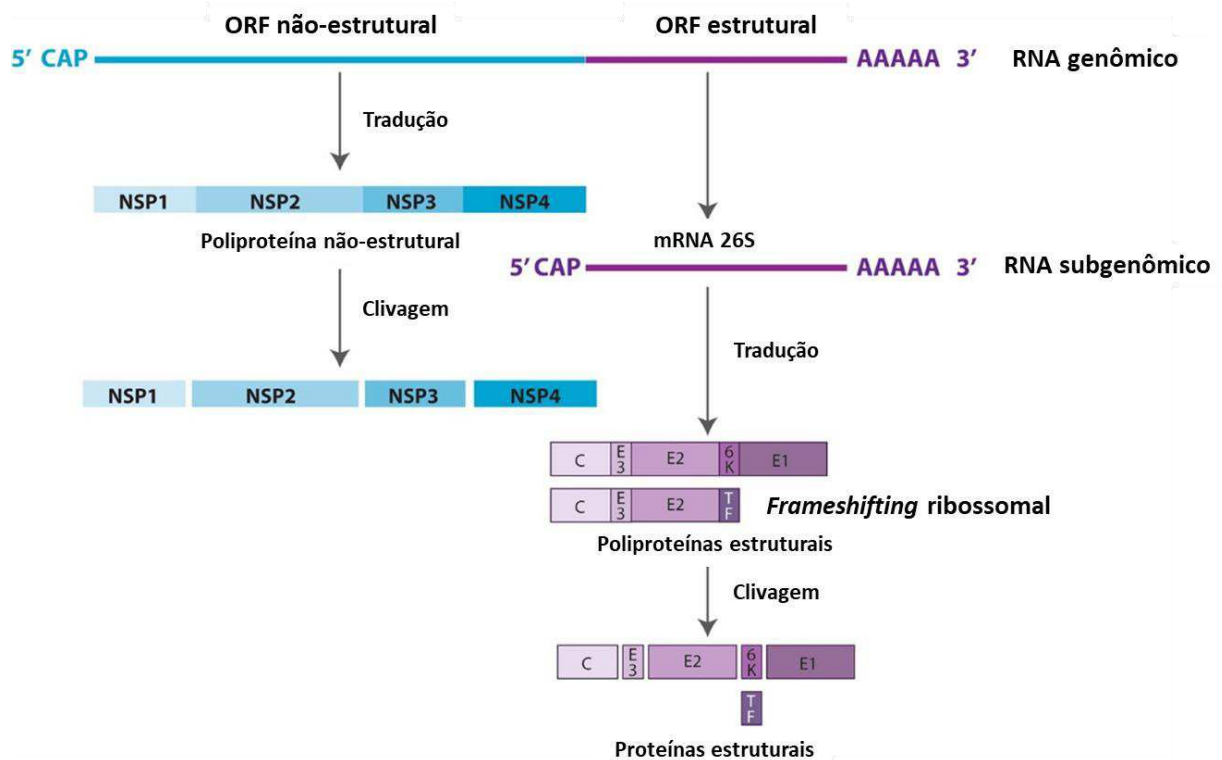


Figura 3 – Genoma de MAYV e proteínas. nsP1: proteína não-estrutural 1; nsP2: proteína não-estrutural 2; nsP3: proteína não-estrutural 3; nsP4: proteína não-estrutural 4; C: proteína do capsídeo; E1: proteína do envelope 1; E2: proteína do envelope 2; E3: proteína do envelope 3; TF: proteína *transframe*. Traduzido de Acosta-Ampudia (2018).

A partícula viral consiste em um nucleocapsídeo com 240 cópias da proteína C que englobam o RNA viral em um arranjo icosaedro com um diâmetro de aproximadamente 70 nm. Ao seu redor, encontra-se o envelope viral, uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, com glicoproteínas do envelope viral E1 e E2 cravadas a ela (240 cópias). Os heterodímeros E1/E2 formam trímeros, se organizando em espículas em torno do nucleocapsídeo (Figura 4). A proteína 6k também é encontrada no envelope viral, ainda que em pequenas quantidades (DE OLIVEIRA MOTA *et al.*, 2015; VANEY; DUQUERROY; REY, 2013).

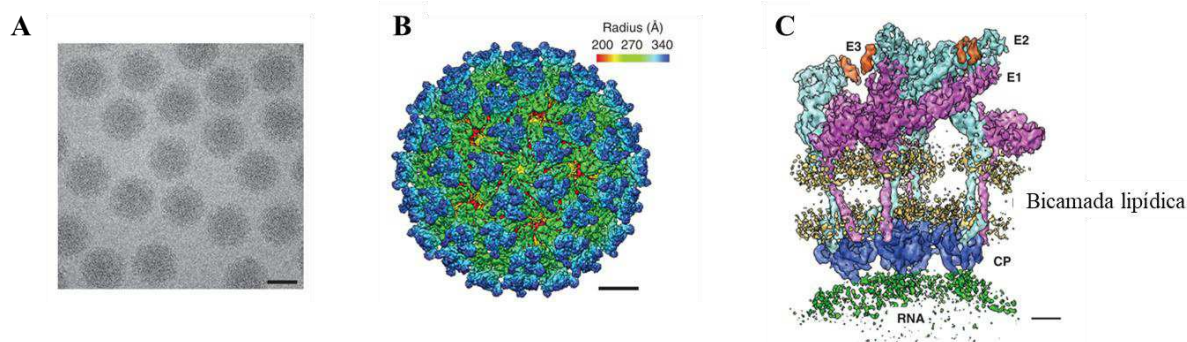


Figura 4 – Representação típica de um alfavírus. (A): Criomicroscopia eletrônica da partícula viral; (B): visão superficial; (C): Imagem ampliada da superfície mostrando a organização das proteínas E1, E2, E3 e a bicamada lipídica. A proteína do capsídeo (CP) interage com a bicamada e o RNA viral. Adaptado de Zhang *et al.* (2011).

E1 é uma proteína integral de membrana que atua na fusão do envelope viral com a membrana endossomal celular, por meio da inserção de um peptídeo de fusão (*fusion loop*) que se torna exposto em um pH mais ácido, como o interior do endossomo. A proteína E2, também integral de membrana, é responsável pelo reconhecimento e ligação ao receptor celular, permitindo a adsorção viral. O receptor celular específico a MAYV ainda é desconhecido (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018; VANEY; DUQUERROY; REY, 2013). A proteína E3 ainda não possui todas as suas funções esclarecidas e atua de formas variadas em diferentes alfavírus, mas sabe-se que direciona a tradução das proteínas do envelope para o retículo endoplasmático (RE) por meio de um peptídeo sinal e tem papel crucial na formação do heterodímero E1/E2 dentro do RE de células infectadas, impedindo que o peptídeo de fusão seja liberado prematuramente (VANEY; DUQUERROY; REY, 2013).

Ambas proteínas 6k e TF surgem da mesma região codificadora do genoma, tendo apenas sua janela de leitura modificada (*frameshifting*). Tem função importante na regulação da montagem de novas partículas virais, regulando a ligação da proteína C a E2, formação dos heterodímeros E1/E2 e adsorção viral. Além disso, 6k é uma proteína transmembrana, capaz de formar canais de cátions na bicamada lipídica, alterando a permeabilidade da membrana celular e ainda, possui uma sequência-sinal de translocação de E1 para o interior do RE (LILJESTROM; GAROFF, 1991; MELTON *et al.*, 2002). Os mecanismos específicos de cada uma delas ainda são desconhecidos porém sabe-se que a deleção ou mutação de tais proteínas

afeta a capacidade de adsorção viral e liberação de novos vírions (BROWN ID; ID; KIELIAN, 2018; SNYDER *et al.*, 2013).

Em relação as proteínas não-estruturais, acredita-se que nsP1 esteja relacionada a iniciação e manutenção do processo de replicação do RNA de polaridade negativa, além de ancorar o complexo de replicação a membrana citoplasmática. Esta proteína possui atividade guanililtransferase e guanina-7-metiltransferase, funções relacionadas a metilação de guanina e capeamento do RNA viral. A proteína nsP2 possui diversas funções relacionadas a replicação do genoma viral. Sua porção N-terminal exibe função helicase, necessária para remoção de estruturas secundárias de RNA durante a replicação; funções nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e 5'-trifosfatase dependente de RNA, que são importantes para replicação e capeamento do mRNA viral. Já em sua região C-terminal, nsP2 exibe atividade cisteína protease, necessária no processamento da poliproteína não-estrutural e um sinal de localização nuclear. Quando localizada no núcleo, nsP2 inibe a síntese proteica e a resposta antiviral da célula hospedeira, bloqueando a via de sinalização JAK/STAT, uma das principais defesas celulares contra infecções virais (BAKAR; NG, 2018; FROS *et al.*, 2013).

A proteína nsP3 é a menos conhecida de todas as proteínas não-estruturais, porém algumas funções já foram identificadas no estudo de outros alfavírus. Essa proteína contém uma região C-terminal hipervariável, que apresenta alta variabilidade mesmo entre espécies próximas; uma região central de ligação a zinco (*alphavirus unique domain*) cuja função ainda não está definida, mas se mostra relacionada a replicação do RNA viral; e uma porção N-terminal altamente conservada, denominada macrodomínio, com domínios de ligação a ácido nucleico e fosfatase. A nsP3 colocaliza-se com intermediários de RNA fita dupla e interage com as demais nsPs, formando o complexo replicativo (GÖTTE; LIU; MCINERNEY, 2018).

A nsP4 possui a sequência mais conservada dentre todas as proteínas dos alfavírus, com função polimerase dependente de RNA em sua região C-terminal, isto é, atua diretamente na replicação do material genético viral via síntese do RNA de polaridade negativa e do RNA 26S subgenômico. A região N-terminal é importante para a interação com a poliproteína estrutural (P123) e formação do complexo replicativo. Além disso, esta região também possui função adenililtransferase, formando a cauda poliadenilada de mRNA (BAKAR; NG, 2018).

Ciclo de replicação

O ciclo de replicação de MAYV segue o modelo descrito para todos os alfavírus e está ilustrado na Figura 5.

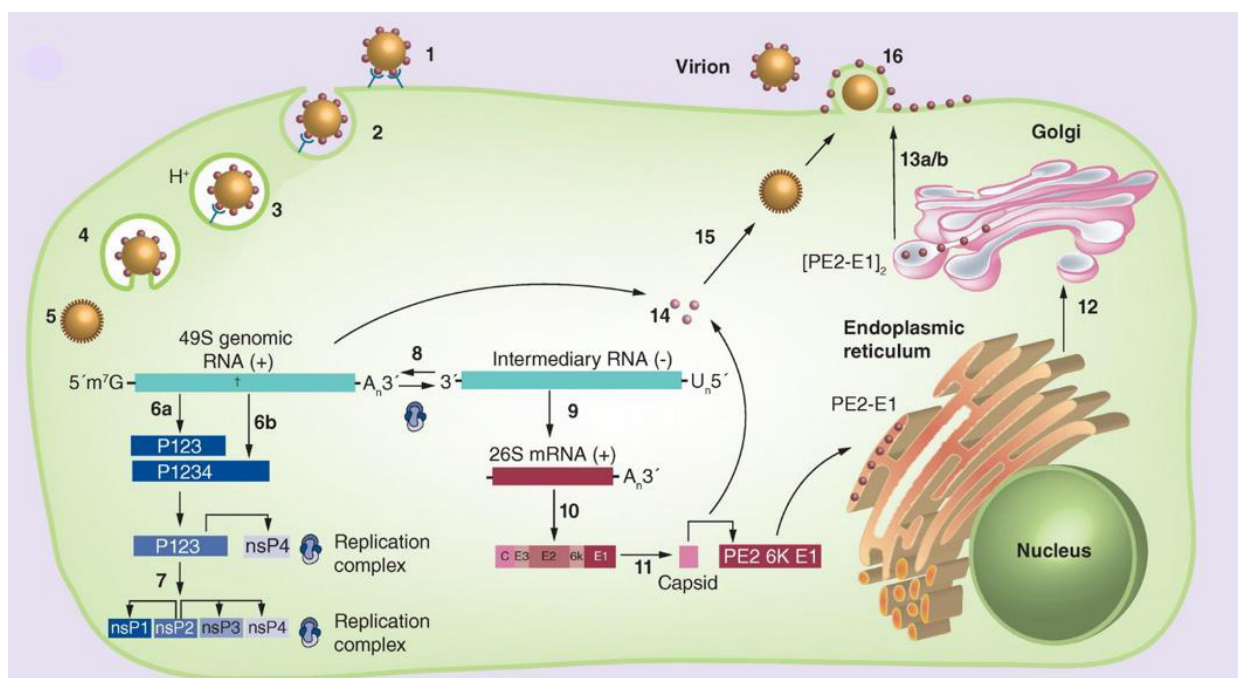


Figura 5 – O ciclo replicativo de MAYV. (1): ligação ao receptor celular; (2): internalização por endocitose; (3): fusão da membrana; (5): desnudamento do nucleocapsídeo; (6a): tradução; (6b): tradução; (7): processamento; (8): transcrição do RNA(-); (9): transcrição do RNA subgenômico; (10): tradução; (11): liberação da proteína C; (12): processamento e maturação das glicoproteínas; (13a): transporte para a membrana celular; (13b): formação das espículas via furinas; (14): empacotamento do RNA genômico; (15): montagem do nucleocapsídeo; (16): brotamento das novas partículas virais. Adaptado de Mota *et al* (2015).

MAYV inicia seu ciclo a partir do reconhecimento e ligação da proteína E2 a um receptor celular ainda desconhecido. A partícula viral é internalizada pela célula hospedeira via endocitose mediada por clatrina, sendo a principal via utilizada pelo vírus para invasão celular. De forma alternativa, MAYV também utiliza da via dependente de vesículas de caveolina, ainda que em menor frequência. O colesterol tem papel importante nesta via, uma vez que está presente nestas vesículas formando microdomínios, importantes para a estrutura vesicular e que interagem com as proteínas de MAYV (CARVALHO *et al.*, 2017). A seguir, o vírus é transportado para dentro de endossomos. O baixo pH do ambiente endossomal induz a fusão

do envelope viral com a membrana do endossomo, ocasionando o desnudamento da partícula viral. Hidrolases endossomais atuam sobre os heterodímeros E1/E2, separando as proteínas e o meio ácido provoca mudanças conformacionais em E1, expondo seu peptídeo de fusão hidrofóbico. E1 forma homotrímeros que se associam a membrana endossomal via a inserção do peptídeo, o qual forma poros entre as membranas, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma (YAT-SING LEUNG; MAH-LEE NG; JANG HANN CHU, 2011).

O mecanismo de desnudamento da partícula viral ainda é parcialmente desconhecido, porém é sabido que este processo é facilitado pela interação entre RNA ribossomal 60S e a proteína viral C. Após, o desmonte do nucleocapsídeo, o RNA viral é liberado no citoplasma e é mobilizado para a síntese proteica (YAT-SING LEUNG; MAH-LEE NG; JANG HANN CHU, 2011). O RNA genômico é diretamente traduzido em duas poliproteínas não-estruturais, P123 e P1234. A P1234 passa por uma clivagem proteolítica, liberando P123 e nsP4, que formam o primeiro complexo replicativo. Este complexo é instável e de curta meia-vida, capaz de sintetizar poucas cópias do RNA (-). Após mais etapas de processamento, as quatro proteínas são liberadas e se associam para a formação de um complexo replicativo estável responsável pela produção de mais cópias de RNA genômico e subgenômico. Este complexo posiciona-se na região perinuclear, integrado a membrana citoplasmática de vesículas agregadas, denominadas vacúolos citopáticos do tipo I (DE OLIVEIRA MOTA *et al.*, 2015).

A proteína nsP2 atua como fator de transcrição do RNA subgenômico, que origina uma poliproteína estrutural (C-E3-E2-6k-E1) após sua tradução. A proteína TF surge a partir de uma mudança na janela de leitura de -1 na sequência codificadora para 6k, originando a poliproteína estrutural C-E3-E2-TF. A proteína C é a primeira a ser liberada, após uma reação de autocatálise no domínio C-terminal da poliproteína. Em seguida, as proteínas E1 e 6k são liberadas após serem processadas por enzimas proteolíticas celulares. A poliproteína restante, denominada pE2 (corresponde as proteínas E2 e E3 ligadas), contém uma sequência-sinal de translocação para o retículo endoplasmático, juntamente com E1 e 6k, prosseguindo para o complexo de Golgi. A medida que avançam na via secretória, as proteínas do envelope sofrem modificações pós-traducionais como glicosilação, permitindo a formação de um complexo entre pE2 e E1. Este complexo tem o objetivo de proteger o peptídeo de fusão de E1 e evitar sua exposição precoce. Na rede trans-Golgi, a enzima furina promove a clivagem de pE2 em E2 e E3, liberando as proteínas E1 e E2 maduras. Há a formação do heterodímero E1-E2 e em seguida, a formação de trímeros (espículas). Os trímeros participam ativamente na montagem de novas partículas virais, em conjunto com a proteína C, que se complexa e interage com E2, induzindo

a formação do nucleocapsídeo. Além disso, a proteína C também está envolvida no reconhecimento e empacotamento do RNA genômico. A fusão das proteínas do nucleocapsídeo e do envelope viral promovem a liberação dos novos vírions envelopados para o meio extracelular (BROWN *et al.*, 2018).

Manifestações clínicas e patogênese viral

Os sintomas relacionados a febre do Mayaro são considerados inespecíficos, de intensidade leve a moderada e potencialmente debilitantes. São Sintomas semelhantes são observados em outras arboviroses, como febre chikungunya e dengue porém neste caso, os danos articulares frequentemente evoluem para o quadro de artrite, que pode persistir por até 12 meses após a infecção (PINHEIRO *et al.*, 1981). A doença possui duas fases: aguda e convalescente. A fase aguda se caracteriza por um período de viremia, em que o vírus pode ser detectado no sangue, com duração de 3 a 7 dias. A seguir, há um período de incubação de 7 a 12 dias, em que o vírus atinge órgãos como fígado e baço para a replicação. O vírus migra para outros tecidos-alvo como muscular e ósseo, onde se replica e os sintomas principais da doença se iniciam: artralgia e mialgia (dores articulares e musculares), edemas articulares, febre, manchas avermelhadas com prurido, dores de cabeça e dores oculares. A segunda fase é chamada de convalescente, caracterizada por artralgia persistente e debilitante, atingindo joelhos, pulsos, mãos, pés e cotovelos. A artralgia pode permanecer por semanas ou meses pós-infecção. Há a possibilidade do desenvolvimento de artrite (inflamação crônica nas articulações), ainda que relatado em menor frequência. Leucopenia, isto é, diminuição na taxa sanguínea de leucócitos também é frequentemente detectada (DE OLIVEIRA MOTA *et al.*, 2015).

Estudos com RRV e CHIKV foram responsáveis por grande parte do conhecimento adquirido sobre a patogênese dos alfavírus. A infecção por MAYV resulta em um quadro predominantemente inflamatório, com a indução de citocinas inflamatórias como TNF- α . Camini e colaboradores (2017) demonstraram que a infecção por MAYV causa estresse oxidativo em células HepG2, uma linhagem de células hepáticas, e células J774, uma linhagem murina de macrófagos. Foi verificado um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), estratégia que a célula hospedeira utiliza no combate de uma infecção viral. Porém, com a progressão da infecção e produção de novas partículas virais, mais espécies oxidativas são

geradas, acarretando um excesso de ERO. Apesar de um aumento da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase ter sido verificado, os níveis de ERO continuaram elevados comparados ao controle, indicando que a célula não foi capaz de reverter o desequilíbrio oxidativo. Caetano e colaboradores (2019) corroboram os resultados observados e oferecem mais evidências de que o desequilíbrio das defesas antioxidantes da célula relaciona-se a patogênese viral. Camundongos Balb/c infectados com MAYV apresentaram danos hepáticos e aumento de biomarcadores de estresse oxidativo, como malondialdeído por até 10 dias pós-infecção. A relação glutatona reduzida e oxidada também sofre alterações na tentativa de combater o estresse oxidativo gerado, porém é insuficiente na eliminação completa de ERO. Além disso, a presença de MAYV foi detectada no tecido hepático por até 7 dias pós-infecção, indicando que o fígado é um sítio de replicação para o vírus.

MAYV utiliza o fígado e baço como sítios primários de replicação e dissemina-se por todo o organismo, até chegar ao músculo, ossos e articulações, possíveis locais de tropismo para o vírus. Nestes tecidos, MAYV acarreta uma grande resposta inflamatória, gerando a fase aguda da doença. Com sintomas bastante similares a CHIKV, o processo inflamatório ocasiona febre, mialgia e artralgia que podem persistir por meses após a infecção (SANTOS *et al*, 2019).

Santiago e colaboradores (2015) sugere que, assim como a febre chikungunya, MAYV também acarreta uma resposta imune predominantemente inflamatória. O estudo avaliou a resposta imune gerada por MAYV em indivíduos infectados por 12 meses após a infecção. Verificou-se alta produção de anticorpos neutralizantes por até três meses pós-infecção, porém apenas este tipo de resposta imune não foi suficiente para proteger o indivíduo contra o desenvolvimento da doença. Além disso, o nível de citocinas pró-inflamatórias aumenta e se mantém elevado mesmo 12 meses após a infecção. A quimiocina MCP-1, responsável por induzir a migração e infiltração de macrófagos, atinge seu pico durante a fase aguda e permanece elevada durante a fase convalescente (20 dias pós-infecção), na qual também se observou aumento de IL-2 e IL-9, envolvidas na proliferação celular. Outras citocinas pró-inflamatórias como IL-7, IL-13 e VEGF foram detectadas em níveis elevados apenas em pacientes com artralgia persistente e apontados como possíveis indicadores da severidade da doença. Este mesmo quadro pró-inflamatório também foi comprovado por Tappe *et al.* (2016), que observou em indivíduos infectados por MAYV os mesmos sintomas e níveis elevados de citocinas inflamatórias durante a fase convalescente da doença.

MAYV também reproduz o padrão inflamatório em macrófagos. O vírus é capaz de replicar nas linhagens RAW 264.7 e J447, ambas de macrófagos e induz a apoptose celular. A

medida que a infecção prossegue, há um aumento da produção de ERO e secreção de TNF- α , um mediador pró-inflamatório e intimamente relacionado ao desenvolvimento de artrite. A produção de TNF- α é induzida por ERO, levando a ativação da via de morte celular e gerando dano tecidual (CAVALHEIRO *et al.*, 2016).

Recentemente, Santos e colaboradores (2019) propôs um modelo murino para MAYV, no qual avalia o desenvolvimento da doença em camundongos Balb/c. Seus resultados corroboram com estudos anteriores que evidenciaram a relação entre a resposta pró-inflamatória e artralgia/mialgia. Foram observados danos no tecido muscular entre 3 e 7 dias pós-infecção, com acúmulo de infiltrados inflamatórios e degeneração de fibras musculares. Os animais apresentaram dor articular persistente, por vezes debilitante, e perda de força. Todo este quadro foi justificado pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IFN- γ e a quimiocina MCP-1.

1.3. Vacinas

Atualmente, não há vacinas disponíveis para MAYV no mercado. Algumas propostas já foram apresentadas, a primeira por Robinson e colaboradores (1976), que utilizaram uma linhagem selvagem de MAYV inativada por formalina e testou em camundongos CD-1 imunocompetentes. A formulação proposta demonstrou ser imunogênica e apresentou eficácia mediana no desafio com o vírus. Mais tarde, uma nova proposta foi desenvolvida por Weise e colaboradores (2014) que emprega uma linhagem atenuada de MAYV. Nessa vacina, há uma substituição no SIER dSAFo genoma de MAYV pelo do *Encephalomyocarditis virus* (ECMV). Essa estratégia resultou na redução da tradução das proteínas estruturais virais e abolição da capacidade de replicação em células de mosquito. Chuong (2019) desenvolveu plasmídeos contendo o genoma de MAYV sob o controle do promotor de citomegalovírus. Essa construção foi testada tanto em cultura celular quanto modelo animal e demonstrou a mesma capacidade de infecção viral, uma abordagem que pode facilitar o desenvolvimento de vacinas de DNA. Choi e pesquisadores (2019) por sua vez, desenvolveram uma construção contendo toda a sequência da proteína E, que gerou resposta imune neutralizante em testes *in vivo* e ainda conferiu proteção a camundongos *knockout* para o receptor de interferon frente ao desafio com o vírus.

Em contrapartida, Khan e colaboradores (2019) utilizam a bioinformática como abordagem para a predição de uma vacina de subunidades contra MAYV. O modelo proposto incluiu cinco epítomos das proteínas estruturais do vírus e validou *in silico* sua expressão em *E. coli*, porém, experimentos para validação *in vivo* ainda são necessários.

1.4. Diagnóstico e tratamento

Como parte do complexo Semliki, testes sorológicos para MAYV frequentemente podem ter reatividade cruzada com outras arboviroses pertencentes a este grupo. A sintomatologia semelhante a outras arboviroses também dificulta o diagnóstico correto e ainda subestima o número de casos reais. Os principais testes laboratoriais empregados para detecção da resposta imune contra o vírus, que reconhecem anticorpos IgM ou IgG. Os *kits* diagnóstico geralmente são baseados em: inibição de hemaglutinação (HI), fixação de complemento (FC), teste de neutralização (NT), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas como antígeno (EIA-ICC). A combinação entre diferentes testes sorológicos pode diminuir a chance de um resultado errôneo.

A melhor estratégia para detecção de MAYV é o seu isolamento a partir do sangue. O teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) é considerado o ‘padrão-ouro’ para este caso, pois possui alta sensibilidade e especificidade. O vírus isolado é colocado em cultura celular e os efeitos citopáticos são observados e quantificados em placas de lise. As linhagens mais utilizadas são Vero-76 e BHK-21. Apesar de bastante eficaz, esta técnica tem alto custo e é dispendiosa, tornando-a pouco utilizada.

O diagnóstico diferencial é o principal desafio para o desenvolvimento de novos protocolos e métodos para detecção do MAYV. Os sintomas manifestados podem ser confundidos com outras arboviroses, como dengue e febre chikungunya. Técnicas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas, especialmente baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida da reação de transcrição reversa (RT-PCR), por possuírem alta especificidade e serem capazes de detectar o vírus nos estágios iniciais da viremia. Diversos protocolos têm sido desenvolvidos para tornar mais preciso e rápido o diagnóstico, utilizando primers genéricos para alfavírus ou específicos para os genes de nsP1, nsP2 ou E1 de MAYV. Naveca (2017) desenvolveu um método de alta sensibilidade e especificidade para detecção simultânea de MAYV e vírus Oropouche (OROV) por meio de uma RT-PCR multiplex (*one-step multiplexed*

RT-qPCR). Com eficiência de amplificação acima de 98% para ambos os vírus, o método ainda possuía um limite de detecção de 2 a 20 cópias. Wagonner e colaboradores (2018) descreveram um método rápido para diagnóstico a partir de amostras de sangue e urina capaz de amplificar um mínimo de oito cópias do RNA viral com 95% de eficiência.

Wang e colaboradores (2006) por sua vez, propuseram um método combinando as técnicas RT-PCR e ELISA para a detecção e diferenciação de alfavírus. O RNA viral é amplificado e convertido em DNA com a RT-PCR utilizando primers específicos para o gene nsP1 de MAYV e em seguida, a técnica ELISA é utilizada com sondas marcadas com biotina e específicas para os amplicons.

Atualmente não há medicamentos específicos para o tratamento da febre do Mayaro, apenas medidas paliativas são utilizadas para alívio dos sintomas. Analgésicos, como paracetamol e acetaminofeno, e antiinflamatórios não-esteroidais, como ibuprofeno, são usualmente prescritos. Devido à similaridade com o quadro causado por CHIKV, alguns dos medicamentos para a febre chikungunya também utilizados para tratar a febre do Mayaro. A cloroquinona, uma droga antimalárica, tem sido utilizada para o alívio da artrite em CHIKV também pode ser uma alternativa de tratamento para MAYV e a ribavirina tem mostrado boa eficiência no alívio dos sintomas (FIGUEIREDO *et al.* 2014).

1.5. Xantenodionas e tetracetonas

Os xantenos (9H-xantenos) são metabólitos secundários produzidos por diversas plantas superiores, fungos e líquens. A estrutura heterocíclica oxigenada (Figura 6) dos xantenos apresenta similaridades em relação aos flavonoides, assim como um comportamento cromatográfico parecido. Alguns derivados destes xantenos são utilizados como corantes em diversas áreas industriais, como farmacêutica, têxtil e de papel, como a fluoresceína, eosina e rodamina (PIROUZMAND *et al.*, 2016). As xantonas (9H-xanten-9-onas), uma variedade dos xantenos, tem sido isolada de diversas fontes naturais como plantas, fungos e bactérias. Sua estrutura básica é composta de dois anéis aromáticas fusionadas a γ -piranona (DA SILVA *et al.* 2017).

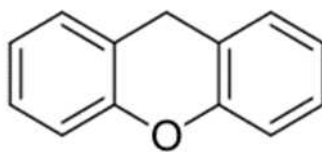


Figura 6 - Estrutura geral dos xantenos (9H-xantenos). Adaptado de Da Silva *et al.* (2017).

As xantonas (1) são classificadas em três grupos: as diidroxantonas (3, 4); tetraidroxantonas (5, 6); e hexaidroxantonas (2), de acordo com o número de ligações duplas em sua estrutura (Figura 7). As xantonas possuem uma grande diversidade de funções biológicas, entre elas, anticarcinogênica, antimalárica, antioxidante, bactericida, fungicida e antiviral (NEGI *et al.*, 2013).

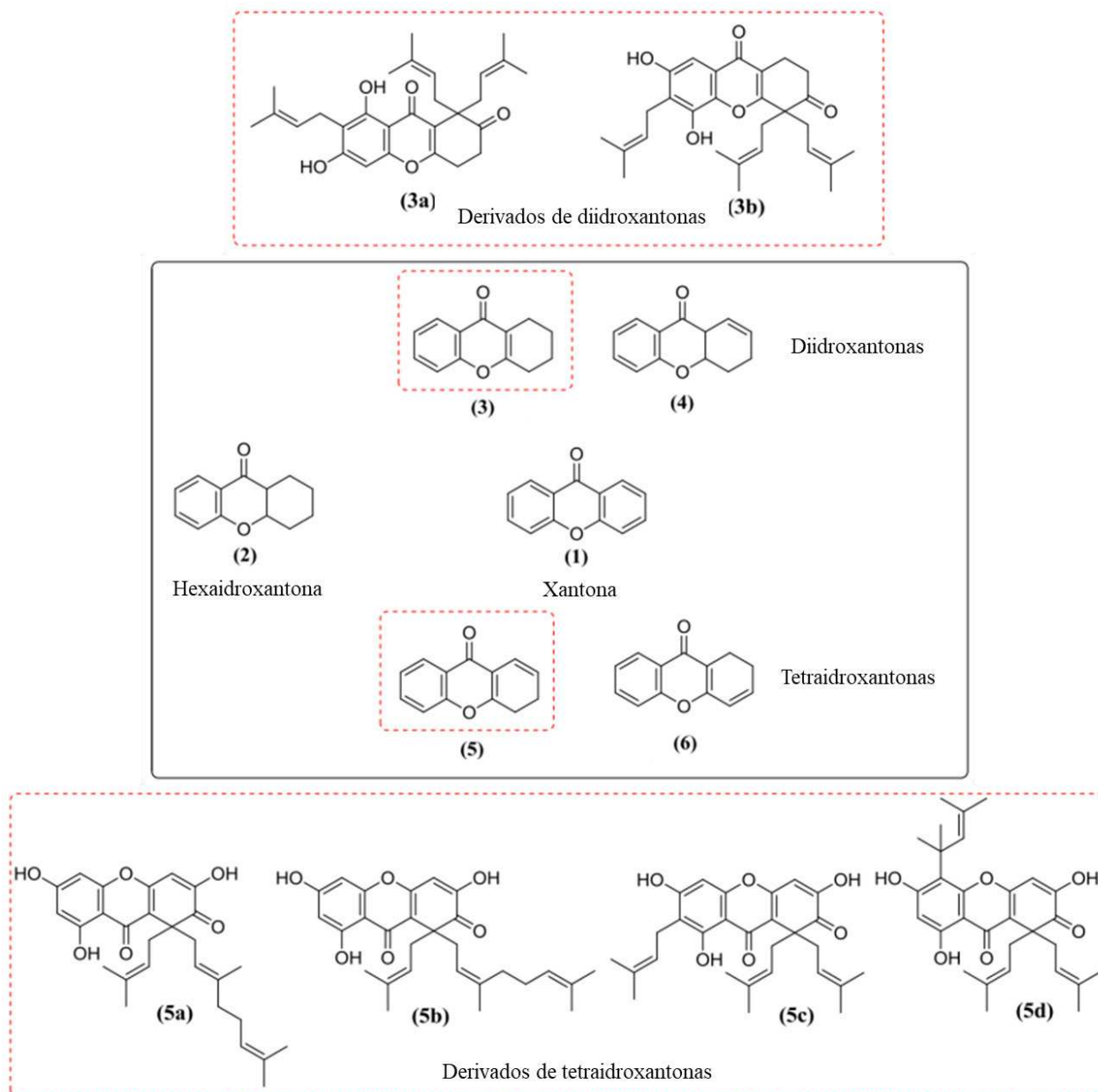
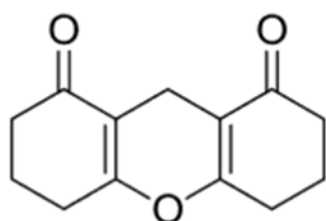


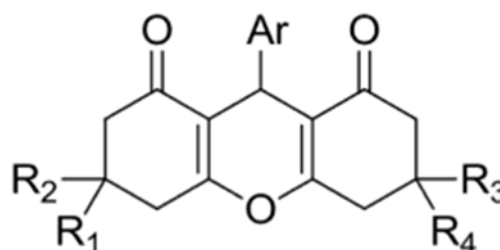
Figura 7 – Subclasses de xantonas e seus derivados naturais diidroxantonas (2) e tetraidroxantonas (5). Traduzido de Da Silva *et al.* (2017).

As xantenodionas (1,8-dioxooctaidroxantonas) são compostos sintéticos derivados das xantonas. São compostos heterocíclicos contendo um núcleo piranosídico fusionado em ambos os lados a anéis de ciclohex-2-enonas (Figura 8). Estas moléculas apresentam atividade antifúngica, anti-inflamatória, antibactericida, leishmanicida e antitumoral (DA SILVA *et al.*, 2017). A sua atividade antiviral contra o vírus Zika (ZIKV) já foi avaliada e comprovada (SILVA, 2018). A citotoxicidade (CC_{50}) de todos os compostos foi calculada por Silva (2018) em seu trabalho na avaliação do potencial antiviral contra ZIKV e os valores foram utilizados

neste trabalho (Anexo I). Devido a esta diversidade de funções biológicas, as xantenodionas tem atraído a atenção de pesquisadores, no intuito de analisar suas propriedades antimicrobianas e aplicá-las em estratégias terapêuticas.



Núcleo xantenodiona



Padrão de substituição

Figura 8 – Estrutura do núcleo de xantenodionas e padrão de substituição típico em que $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ou CH_3 e Ar = grupo aril. Adaptado de Da Silva *et al.* (2017).

As tetracetonas são importantes intermediários na síntese das xantenodionas, conhecidas por suas propriedades antioxidantes, como inibidores da enzima lipoxigenase (KHAN *et al.*, 2008). Além disso, também tem aplicações terapêuticas para disfunções dermatológicas, uma vez que podem inibir a tirosinase. Esta enzima é essencial na síntese de melanina e sua hiperatividade está relacionada ao desenvolvimento de hiperpigmentação e melanoma (KHAN *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é uma demanda constante especialmente para infecções virais. A febre do Mayaro é uma doença negligenciada que ainda não possui tratamento específico ou vacina. Mesmo não sendo letal, tem caráter debilitante, trazendo prejuízos para o paciente e sobrecarga ao sistema público de saúde. O estudo das xantenodionas como antivirais é uma aplicação inédita para esta nova classe de compostos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antiviral das xantenodionas contra MAYV, tendo em vista os parâmetros de proteção da viabilidade celular e efeito de inibição viral.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Realizar uma triagem antiviral para selecionar os compostos capazes de manter a viabilidade celular acima de 50% de células Vero infectadas;
- Definir a concentração efetiva dos compostos capazes de reduzir a atividade viral em 50% (EC₅₀);
- Definir o Índice de Seletividade para estes compostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura celular e vírus

Células Vero (ATCC CCL-81) foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 75 cm² (Kasvi), em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ até atingirem a confluência entre 70-80% e transferidas para placas de 24 e 96 poços de acordo com o ensaio realizado.

Para a manutenção dos estoques virais, a linhagem celular C6/36 de *Aedes albopictus* (ATCC CRL 1660) foi cultivada em meio L15 (*Leibovitz*, Vitrocell) suplementado com 10% de SFB, utilizando garrafas de 75 cm². Para a propagação viral, todo o meio foi retirado e uma

alíquota de 150 µl de MAYV (ATCC VR-66, *strain* 4675) foi adicionada a garrafa com 7 mL de meio L15 suplementado com 2% de SFB. A garrafa foi mantida no homogeneizador por 1 hora à temperatura ambiente para adsorção viral e então incubada por 48 horas em estufa a 28 °C. A seguir, todo o conteúdo foi centrifugado a 1350 x g, por 10 minutos e o sobrenadante transferido para o *Vivaspin® 20* (GE Healthcare) para concentração da amostra. O volume foi suspenso em 1 mL de PBS 1X e armazenado em 20% de SFB a -80 °C.

A titulação viral foi realizada pela contagem das placas de lise. Para tal, células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços (1x10⁶ células/poço) até atingirem a confluência. Após o cultivo, foi realizada a diluição seriada da alíquota viral e 100 µL de cada diluição foram aplicados em triplicata na placa. A placa foi incubada a temperatura ambiente, por 1 hora sob agitação constante, para adsorção viral. A seguir, o meio foi retirado e 1 mL de solução de CMC 3% (carboximetilcelulose 3% diluído em meio DMEM incompleto na proporção 1:2) foi adicionado a cada poço. Incubou-se a placa em estufa a 37 °C, 5% CO₂ por 48 horas. Os efeitos citopáticos foram monitorados durante este período. Para a fixação das células, 1 mL de formaldeído 20% foi adicionado e a placa retornou à estufa para mais 1 hora de incubação, sob as mesmas condições. Após incubação, a placa foi lavada com água destilada e cerca de 2-3 gotas de cristal violeta 5% foram adicionadas, procedeu-se então uma incubação a temperatura ambiente sob agitação constante por 30 minutos.

Após a lavagem da placa foi realizada a contagem das placas de lise. Para determinação do título viral utilizou-se a fórmula $\frac{m \times d}{v}$, em que:

m: média das placas de lise contadas

d: inverso da diluição escolhida

v: volume adicionado em mL.

O título viral foi expresso em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (PFU/mL).

3.2. Xantenodionas e tetracetonas

Os compostos utilizados neste trabalho foram sintetizadas por Silva (2017) e fornecidos pelo Professor Róbson Ricardo Teixeira, do Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa. A síntese das xantenodionas consistiu na reação de um aldeído aromático (I) com

duas moléculas de uma 1,3-dicetona cíclica (II) na presença do catalisador oxiclreto de zircônio, passando por um intermediário tetracetônico (III), que dá origem ao produto final, a xantenodiona (IV) (Figura 9). A reação resultou em diferentes produtos com diferentes substituições (3-11) de acordo com o aldeído escolhido.

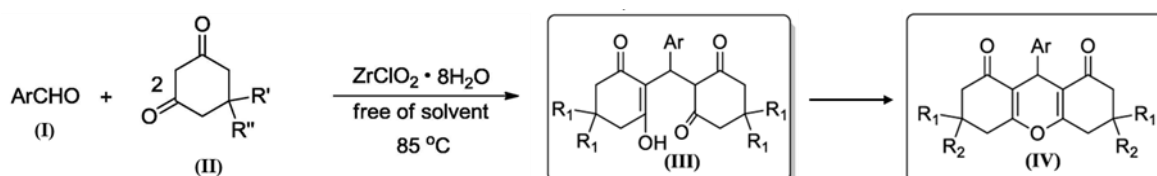


Figura 9 – Reação geral de síntese das xantenodionas. (I): fórmula geral de um aldeído; (II): fórmula geral de uma 1,3-dicetona; (III): intermediário tetracetônico; (IV): produto final xantenodiona em que $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{H}$ ou CH_3 e Ar = radical aromático. Adaptado de Da Silva *et al.* (2017).

Foram utilizadas 22 xantenodionas (compostos 01 a 05 e 08 a 24) e 2 tetracetonas (compostos 06 e 07) neste trabalho para avaliação de seu potencial antiviral contra MAYV em cultura celular. A cada um destes compostos foi atribuído um código em ordem crescente, de 01 a 24, diferente do código atribuído no trabalho de Silva (2017). A relação entre os códigos aqui citados e seus correspondentes está listada no Anexo I, bem como suas respectivas estruturas.

3.3. Triagem antiviral

A triagem antiviral teve o objetivo de selecionar dentre os 24 compostos, aqueles capazes de manter 50% ou mais da viabilidade celular. Para isso, o método do MTT foi empregado. A triagem antiviral foi realizada de todas as 24 xantenodionas utilizando a concentração determinada pelo CC_{50} (os valores estão apresentados no Anexo I e foram determinados por Silva (2018) previamente). Células Vero (1×10^4) foram cultivadas em placas de 96 poços até atingir cerca de 80% de confluência. Após cultivo, foram preparadas diluições em DMEM incompleto com o vírus Mayaro (MOI 1) e o composto (concentração final

correspondente ao CC₅₀), mantidas a 37 °C por 1 hora. A seguir, 100 µL das soluções vírus mais composto foram aplicadas em triplicata à placa, que teve o meio previamente retirado.

Para o controle negativo, somente meio DMEM incompleto foi adicionado e para o controle positivo, apenas o vírus foi adicionado. As placas foram então incubadas por 1,5 horas a 37 °C. Após incubação, o sobrenadante foi aspirado e 100 µL DMEM incompleto foi adicionado. A placa permaneceu incubada sob as mesmas condições descritas por 48 horas. Os efeitos citopáticos foram monitorados ao longo deste período. Prosseguiu-se a adição de MTT e leitura da absorbância como descrito no item 3.3. O resultado foi expresso em porcentagem de viabilidade celular. O controle negativo (com apenas células e meio) foi considerado como representante de 100% da viabilidade celular e o controle positivo (com células não-tratadas infectadas por MAYV) foi considerado como 0% da viabilidade celular. As xantenodionas capazes de manter a viabilidade celular em 50% ou mais foram selecionadas para a próxima etapa. Este experimento foi realizado em triplicata. O resultado foi obtido a partir da seguinte fórmula para o cálculo da viabilidade celular (%):

$$1 - \frac{(MA - CP)}{(CP - CN)}$$

Na qual,

MA: média das absovâncias de cada composto;

CP: média das absorvâncias do controle positivo;

CN: média das absorvâncias do controle negativo;

A seguir, os valores obtidos para cada composto foram multiplicados por 100% para conversão dos valores em porcentagem.

3.4. Ensaio de inibição viral

Neste ensaio foram avaliados apenas os compostos selecionados durante a triagem antiviral (item 3.4). A fim de avaliar o efeito direto de cada composto sobre a partícula viral, o método de contagem das placas de lise foi empregado nessa etapa. Para tanto, células Vero (2x10⁶) foram plaqueadas em placas de 24 poços e mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO₂ até atingirem 80% de confluência. Para cada composto, foram realizadas diluições seriadas em

meio DMEM incompleto, a partir da concentração inicial determinada pelo CC_{50} . A estas foram adicionados MAYV (100 PFU) e a mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora. A seguir, o meio da placa foi aspirado e 100 µL de vírus mais composto foram adicionados em triplicata. Os controles positivo e negativo foram definidos como apenas DMEM incompleto e apenas vírus, respectivamente. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante para permitir a adsorção viral. Após a remoção do sobrenadante, 1 mL de CMC 3% foi adicionado e a placa retornou à incubação a 37 °C, por 48 horas. Os efeitos citopáticos foram monitorados durante este período.

A fixação e adição do corante foram realizadas conforme descrito no item 3.1. As placas de lise foram contadas e os resultados foram submetidos a regressão não-linear para a determinação dos valores de EC_{50} .

3.5. Índice de seletividade

De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA) (2006), o índice de seletividade (IS) é a medida utilizada para quantificar a eficiência relativa de um determinado composto em relação ao seu potencial antiviral. Para tanto, utiliza-se os valores obtidos de inibição relativa deste composto sobre a replicação viral em cultura celular e compara-se com a replicação viral na ausência dele. O valor será um resultado da razão entre CC_{50} e EC_{50} do composto em análise. É desejável que IS seja o maior número possível, correspondendo a máxima atividade antiviral com o mínimo de citotoxicidade.

3.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism* 8. A regressão não-linear foi utilizada para cálculo dos valores de CC_{50} e EC_{50} . A comparação entre tratamentos e controle foi realizada a partir do teste de múltiplas comparações *one-way ANOVA*.

4. RESULTADOS

4.1. Triagem antiviral

Os 24 compostos foram avaliados quanto a sua capacidade de inibição da atividade antiviral. O resultado foi quantificado em viabilidade celular (%). Dos 24 compostos avaliados, 8 (03, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 12, 15) mantiveram a viabilidade celular em 50% ou mais, como indicado na Figura 10. Estes compostos foram selecionados para a próxima etapa.

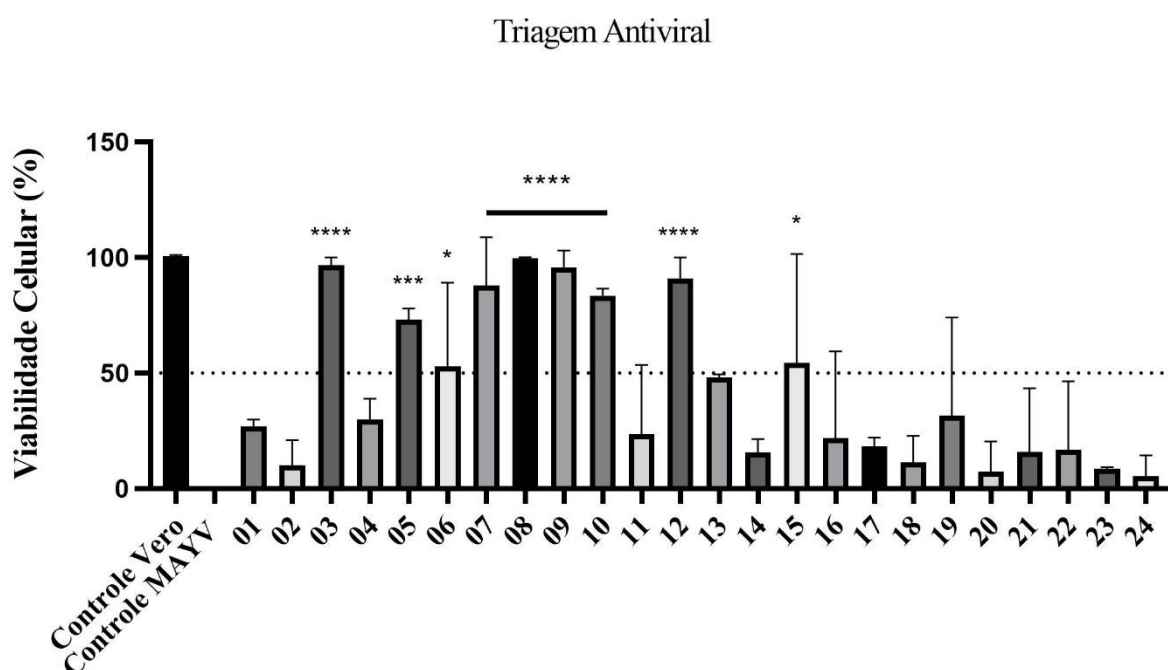


Figura 10 – Triagem antiviral de xantenodionas (01-24) contra MAYV. A viabilidade celular foi quantificada pelo método do MTT. O controle Vero foi considerado positivo (100% de viabilidade celular). O controle MAYV foi considerado negativo (0% de viabilidade celular). Média de três experimentos independentes utilizando *one-way ANOVA test*. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

4.2. Citotoxicidade, concentração efetiva e índice de seletividade

Na tabela 1 são apresentados os valores de CC₅₀, EC₅₀ e IS obtidos para todos os compostos testados.

Tabela 1 – CC₅₀, EC₅₀ e Índice de Seletividade (IS) para xantenodionas.

Composto	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	IS
03	292,60	45,7	6,4
05	27,64	87,1	0,3
07	91,21	8,4	10,8
08	336,8	65,3	5,2
09	338,8	21,5	15,8
10	324,1	Indeterminado*	Indeterminado*
12	345,4	77,1	4,8
15	343,7	Indeterminado*	Indeterminado*

*O IS calculado não foi considerado pois o coeficiente de correlação (R^2) da regressão não-linear estava abaixo de 0,90.

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para os dois compostos de maior IS e suas respectivas estruturas químicas. A 2,2-(5-(4-clorofenil)furan-2-il)metileno)bis(5,5-dimetilcicloexano-1,3-diona) ou composto 07, e a 9-(5-(4-clorofenil)furan-2-il)-3,6-dimetil-3,4,5,6,7,9-hexaidro-1*H*-xanteno-1,8(2*H*)-diona ou composto 09 apresentaram IS de 10,8 e 15,8, respectivamente. O restante dos valores de IS calculados estão apresentados na tabela 1. Para os compostos 10 e 15, os valores IS gerados não puderam ser considerados pois a regressão não-linear teve um baixo coeficiente de correlação (<0,90). Conforme demonstrado na figura 11 e tabela 1, os compostos 07 e 09 apresentaram uma relação dose-dependente entre a concentração e redução da atividade viral. O composto 07 apresentou um IS menor que 09,

porém sua concentração efetiva foi de 11,4 μM , valor inferior ao calculado para o composto 09.

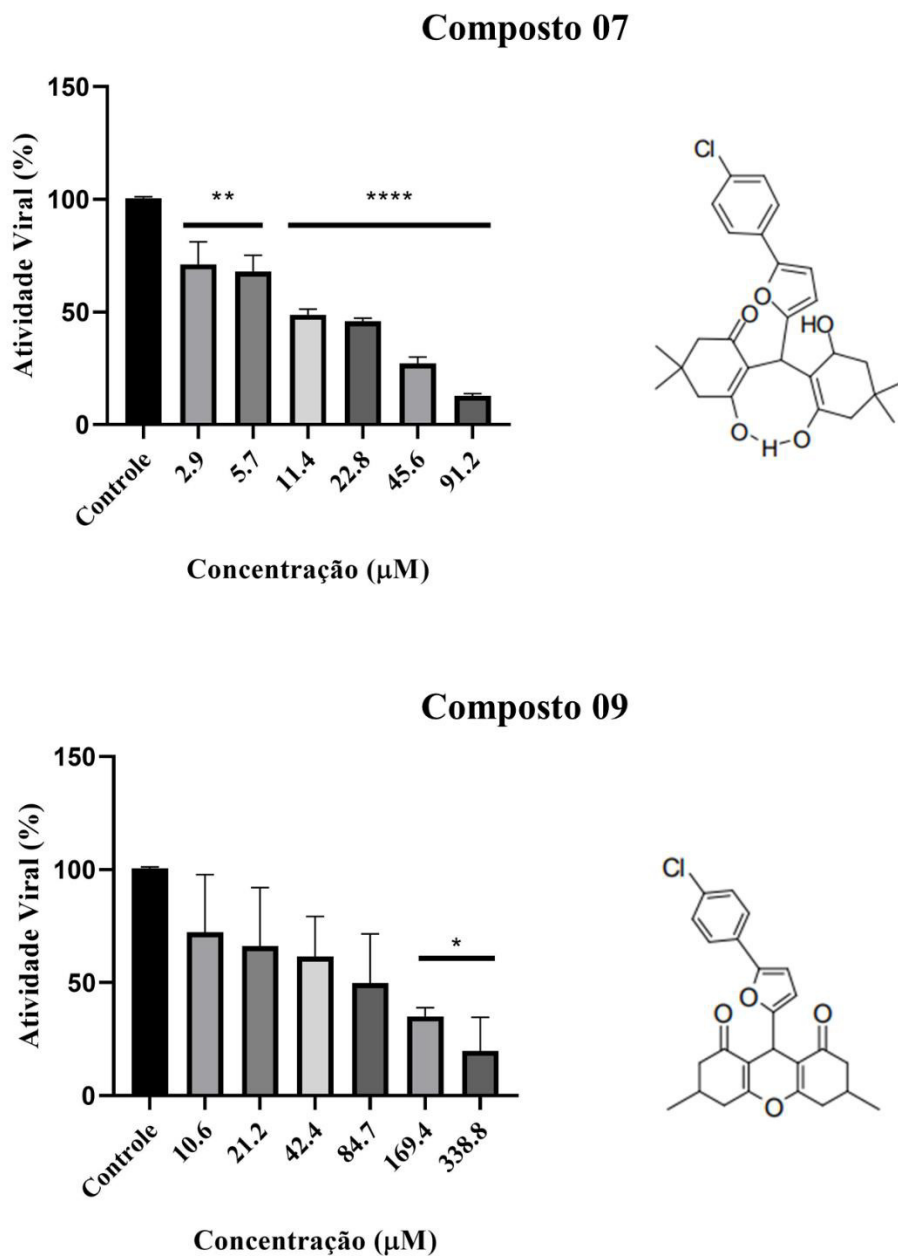


Figura 11 – Ensaio de inibição viral das xantenodionas 07 e 09 e suas respectivas estruturas. A atividade viral foi quantificada pelo método das placas de lise. Células Vero foram incubadas com diluições seriadas de cada composto e MAYV (100 PFU) por 1 hora, 37 °C. Como controle, MAYV (100 PFU) foi adicionado em volumes iguais de DMEM, sob as mesmas condições. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$.

5. DISCUSSÃO

A fim de avaliar de modo geral a performance dos compostos na inibição viral, a triagem foi o primeiro ensaio realizado. Com este ensaio, foi possível selecionar candidatos promissores para serem utilizados nos próximos testes. A partir dos valores de citotoxicidade (CC_{50}) previamente definidos por Silva (2018), os compostos foram avaliados quanto a sua capacidade de manter a viabilidade de células Vero infectadas em relação aos controles positivo e negativo. Utilizando o método do MTT, a inibição da atividade viral pôde ser mensurada em porcentagem de viabilidade celular. Das 24 xantenodionas testadas, 8 mantiveram a viabilidade celular acima 50%, sendo elas: 03, 05, 07, 08, 09, 10, 12, 15, 16. Estes compostos foram selecionados para o ensaio de inibição viral.

O ensaio de inibição viral teve o objetivo de avaliar o impacto direto das xantenodionas sobre a partícula viral, isto é, se de alguma forma, o composto seria capaz de prejudicar a infecção viral em alguma etapa do seu ciclo e em que concentração reduziria a atividade viral em 50%. O EC_{50} foi calculado para cada um dos oito compostos, assim como o índice de seletividade (tabela 2). Os compostos 07 e 09 apresentaram os maiores índices, de 10,8 e 15,8, respectivamente. Nos gráficos correspondentes foi observado uma relação dose-dependente, na medida em que o aumento da concentração de composto causa uma diminuição da atividade viral. Mesmo apresentando um IS maior, o composto 07 também foi selecionado pois é capaz de reduzir a atividade viral em 50% numa concentração de 11,4 μ M, valor menor do que o encontrado para o composto 09. Além disso, os dois compostos dividem semelhanças em suas estruturas químicas: ambos possuem ligados ao carbono 3 o grupamento furano ligado a uma clorofenila (Figura 11). Estruturalmente, o composto 7 é classificado como uma tetracetona, um intermediário na síntese das xantenodionas. Já o composto 9 é classificado como uma hexaidroxantenodiona. Os compostos 07 e 09 já foram avaliados quanto a seu potencial leishmanicida. Ambos apresentaram atividade contra a forma promastigota de *Leishmania amazonenses*. O composto 07 foi o mais ativo, com EC_{50} igual a 27,08 μ g/mL e o maior IS, 2,67 (SILVA, 2017).

As tetracetonas já foram descritas na literatura por suas inúmeras aplicações biológicas. Khan e colaboradores (2008) demonstraram um método alternativo para a síntese de uma série de tetracetonas e sua atividade inibitória da lipoxigenase e consequente efeito antioxidante. Um dos compostos ativos possuía um núcleo tetracetona ligado a um anel furano.

As xantonas, classe de compostos naturais de estrutura química semelhante as xantenodionas, já teve seu potencial antiviral comprovado. Xantonas isoladas de *Poligala karensium* tiveram efeito inibitório sobre a enzima neuraminidase do vírus Influenza A de H1N1 e H9N2. Esta enzima é um dos principais alvos terapêuticos para o combate deste vírus, que atua na liberação das novas partículas virais e propagação viral (DAO *et al.*, 2012). Em *Aspergillus iizokuae*, uma série de xantonas contendo átomos de cloro apresentaram efeito de inibição viral sobre HIV, HSV-1 e HSV-2 em testes com células Vero (KANG *et al.*, 2018).

O radical halogenado clorofenila também pode estar relacionado ao efeito de inibição viral dos compostos 07 e 09. Os halogênios, em especial cloro e bromo, são substituintes comuns no desenho de drogas pois podem aumentar a afinidade de ligação com proteína-alvo. Por meio de ligações de halogênio, estes elementos conseguem interagir com diversos aminoácidos. Grupos com elétrons livres, como hidroxila, carboxila, amida, aromáticos são as possibilidades para a ligação de halogênio (TAN *et al.*, 2014). Recentemente, Silva (2018) descreveu a ação antiviral contra ZIKV de uma dicetona, um produto intermediário obtido na síntese das xantenodionas utilizadas neste trabalho. Este composto também continha um substituinte clorado, neste caso a diclorofenila. Ensaios de *docking* molecular comprovaram a interação deste composto com a proteína E do vírus, o qual interferia na formação dos dímeros de E. Como consequência, adsorção, adesão e transporte da partícula viral estariam comprometidos. Visto a recorrência de substituintes clorados em xantenodionas que apresentaram atividade antiviral, é possível que este elemento esteja envolvido com a função biológica dos compostos.

Para elucidar de que modo os compostos 07 e 09 atuam, novos ensaios são necessários, para verificar quais mecanismos de ação estão envolvidos no efeito antiviral observado. Estes ensaios procuram entender se há interferência em alguma das etapas de replicação viral, como adsorção viral, internalização da partícula viral, replicação do genoma, montagem ou transporte dos novos vírions. Há ainda a possibilidade dos compostos atuarem sobre a célula hospedeira, interagindo com proteínas intracelulares ou de membrana.

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a busca de novas abordagens terapêuticas para arboviroses, utilizando compostos sintéticos inéditos. Oliveira e colaboradores (2018) recentemente demonstraram o efeito inibitório das 2-arilideno indan-1,3-dionas contra a protease NS2B-NS3 do *West Nile virus* (WNV) em cultura celular. Os mesmos compostos também inibiram a atividade viral dos quatro sorotipos de dengue (DENV1-4) e ZIKV, possivelmente pelo mesmo mecanismo de ação. A protease NS2B-NS3 é um complexo proteico

viral envolvido no processamento das poliproteínas do vírus. Por ser essencial para o sucesso da replicação viral, é um alvo promissor para o desenvolvimento de antivirais (LI et al., 2017). De modo semelhante, a abordagem tomada neste trabalho pode ser utilizada para orientar futuros ensaios com os compostos 07 e 09.

O número de trabalhos que buscam novas estratégias terapêuticas para MAYV vem aumentando nos últimos anos. Silimarina, um composto natural extraído de *Silybum marianum*, é um medicamento com função hepatoprotetora e que apresenta efeito antiviral sobre uma variedade de vírus, incluindo os alfavírus Mayaro e Chikungunya, os flavivírus Dengue e Hepatite C, e o vírus Influenza. Contra MAYV, silimarina apresentou eficiente efeito inibitório sobre a replicação viral além de atividade antioxidante, reduzindo o dano celular proveniente do estresse oxidativo causado pelo vírus (CAMINI et al., 2018). Ainda não foi esclarecido qual proteína de MAYV é alvo deste composto, porém para DENV e HCV verificou-se que ele interage com a polimerase destes vírus, inibindo a replicação viral (LIU et al., 2019). Já Ferraz (2019) descreveu efeito de inibição viral de um flavonóide isolado do extrato de raízes de *Maytenus imbricata*. O composto apresentou baixa citotoxicidade ($CC_{50} = 1640 \mu M$) e alto índice de seletividade ($IS = 40$) em ensaios com células Vero, reduzindo o título viral por meio da inibição da adsorção e internalização do vírus.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi investigado o potencial de 24 xantenodionas contra o vírus Mayaro. Uma triagem antiviral preliminar selecionou 8 compostos que mantiveram a viabilidade celular acima de 50%. De acordo com os valores de EC_{50} e IS encontrados, os compostos 07 e 09 foram selecionadas para futuros testes. Além disso, devido a sua similaridade química, é possível que os substituintes furano e clorofenila estejam relacionados com a atividade inibitória observada, porém, mais ensaios são necessários para elucidar os mecanismos específicos da ação destes compostos. As xantenodionas são compostos inéditos promissores com potencial a ser explorado no desenvolvimento de antivirais.

7. PERSPECTIVAS

A febre do Mayaro é uma doença negligenciada endêmica de áreas florestadas de países tropicais e está presente em diversos países da América Latina. Seu potencial de emergência e a dificuldade do diagnóstico diferencial são fatores que impulsionam o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta doença, que carece de tratamentos específicos. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, espera-se continuar o estudo das xantenodionas como antivirais, buscando entender mais sobre suas funções biológicas com ensaios *in vitro*. Além disso, análises *in silico* para predição das interações entre grupos químicos e proteínas-alvo também serão de grande ajuda para aprofundar os conhecimentos sob um ponto de vista molecular. Espera-se também validar os achados encontrados com ensaios *in vivo*, utilizando o modelo murino de atrite e miosite previamente descrito por nosso grupo de pesquisa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-AMPUDIA, Yeny *et al.* Mayaro: an emerging viral threat? **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2018.

ALONSO-PALOMARES, Luis A. *et al.* Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Intervirology**, v. 61, n. 6, p. 255-264, 2018.

ANDERSON, Charles R. *et al.* Mayaro virus: a new human disease agent. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012-1016, 1957.

AUGUSTE, Albert J. *et al.* Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742, 2015.

ABU BAKAR, Farhana; NG, Lisa FP. Nonstructural proteins of alphavirus—potential targets for drug development. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 71, 2018.

BROWN, Rebecca S.; WAN, Judy J.; KIELIAN, Margaret. The alphavirus exit pathway: what we know and what we wish we knew. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 89, 2018.

BRUNINI, Sandra *et al.* High frequency of Mayaro virus IgM among febrile patients, Central Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 6, p. 1025, 2017.

CAMINI, Fernanda Caetano *et al.* Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus research**, v. 236, p. 1-8, 2017.

CAMINI, Fernanda Caetano *et al.* Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. **Antiviral research**, v. 158, p. 8-12, 2018.

CARVALHO, Carlos AM *et al.* On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. **PeerJ**, v. 5, p. e3245, 2017.

CAUSEY, Ottis R.; MAROJA, Otavio M. Mayaro virus: a new human disease agent. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1017-1023, 1957.

CAVALHEIRO, Mariana G. *et al.* Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus

- replication. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1485-1499, 2016.
- CHEN, Rubing *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 6, p. 761-762, 2018.
- CHOI, Hyeree *et al.* Protective immunity by an engineered DNA vaccine for Mayaro virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, 2019.
- CHUONG, Christina; BATES, Tyler A.; WEGER-LUCARELLI, James. Infectious cDNA clones of two strains of Mayaro virus for studies on viral pathogenesis and vaccine development. **Virology**, v. 535, p. 227-231, 2019.
- DA SILVA CAETANO, Camila Carla *et al.* Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress is Associated with Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- DA SILVA, Ítalo Esposti Poly *et al.* Xanthenedione (and intermediates involved in their synthesis) inhibit Zika virus migration to the central nervous system in murine neonatal models. **Microbes and Infection**, 2020.
- DA SILVA, M. L.; TEIXEIRA, R. R.; AMARANTE, G. W. Book chapter: Different Concepts of Catalysis in the Synthesis of Xanthenediones: A Brief Overview. *Advances in Organic Synthesis*. Bentham Science Publishers, 7 ed., v. 07, p. 199-227, 2017.
- DAO, Trong Tuan *et al.* Xanthenes from *Polygala karensium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 11, p. 3688-3692, 2012.
- DODERO-ROJAS, E. *et al.* Modeling Chikungunya control strategies and Mayaro potential outbreak in the city of Rio de Janeiro. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0222900, 2020.
- ESPOSITO, Danilo Lucas Alves; FONSECA, Benedito Antonio Lopes da. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil?. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540-544, 2017.
- EVALUATION, CfD. Research, 2006. Guidance for Industry Antiviral Product Development-Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.

FERRAZ, Ariane Coelho *et al.* De inibição virall activity of proanthocyanidin against Mayaro virus. **Antiviral research**, v. 168, p. 76-81, 2019.

FIGUEIREDO, Mario Luis Garcia de; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677-683, 2014.

FROS, Jelke J. *et al.* The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling. **Journal of virology**, v. 87, n. 18, p. 10394-10400, 2013.

GÖTTE, Benjamin; LIU, Lifeng; MCINERNEY, Gerald M. The enigmatic alphavirus non-structural protein 3 (nsP3) revealing its secrets at last. **Viruses**, v. 10, n. 3, p. 105, 2018.

KANG, Hui-Hui *et al.* Potential antiviral xanthones from a Coastal Saline Soil fungus *Aspergillus iizukae*. **Marine drugs**, v. 16, n. 11, p. 449, 2018.

KHAN, Khalid Mohammed *et al.* Tetraketones: a new class of tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 2, p. 344-351, 2006.

KHAN, Shahzeb *et al.* Immunoinformatics and structural vaccinology driven prediction of multi-epitope vaccine against Mayaro virus and validation through in-silico expression. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 73, p. 390-400, 2019.

LEUNG, Jason Yat-Sing; NG, Mary Mah-Lee; CHU, Justin Jang Hann. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in virology**, v. 2011, 2011.

LI, Zhong; ZHANG, Jing; LI, Hongmin. Flavivirus NS2B/NS3 protease: structure, function, and inhibition. In: **Viral proteases and their inhibitors**. Academic Press, 2017. p. 163-188.

LILJESTRÖM, P.; GAROFF, Henrik. Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. **Journal of virology**, v. 65, n. 1, p. 147-154, 1991.

LIU, Ching-Hsuan *et al.* Antiviral Activities of Silymarin and Derivatives. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1552, 2019.

LONG, Kanya C. *et al.* Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **The**

American journal of tropical medicine and hygiene, v. 85, n. 4, p. 750-757, 2011.

MACKAY, Ian M.; ARDEN, Katherine E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city?. **Microbes and infection**, v. 18, n. 12, p. 724-734, 2016.

MAVIAN, Carla *et al.* Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

MELTON, Julian V. *et al.* Alphavirus 6K proteins form ion channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46923-46931, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Boletim Epidemiológico n. 28. v. 50. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>.

MOHAMMED KHAN, Khalid *et al.* An alternative method for the synthesis of tetraketones and their lipoxygenase inhibiting and antioxidant properties. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 4, n. 4, p. 272-278, 2007.

MOTA, Mânlio Tasso de Oliveira *et al.* Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future virology**, v. 10, n. 9, p. 1109-1122, 2015.

MOURÃO, Maria Paula Gomes *et al.* Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.

NAVECA, Felipe Gomes *et al.* Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 7, p. 510-513, 2017.

NEGI, J. S. *et al.* Naturally occurring xanthenes: chemistry and biology. **Journal of Applied Chemistry**, v. 2013, 2013.

OLIVEIRA, Ana Flávia C. da S. *et al.* Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1, 3-diones and evaluation of their inhibitory activity against NS2B-NS3 WNV protease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 149, p. 98-109, 2018.

Pan American Health Organization (PAHO). Epidemiological Alert Mayaro fever, 2019.

PINHEIRO, Francisco P. *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 3, p. 674-681, 1981.

PIROUZMAND, Mahtab *et al.* [CTA] Fe/MCM-41: An efficient and reusable catalyst for green synthesis of xanthene derivatives. **Arabian journal of chemistry**, v. 10, n. 8, p. 1070-1076, 2017.

ROBINSON, David M. *et al.* Inactivated Mayaro vaccine produced in human diploid cell cultures. **Military medicine**, v. 141, n. 3, p. 163-166, 1976.

SANTIAGO, Felix W. *et al.* Long-term arthralgia after Mayaro virus infection correlates with sustained pro-inflammatory cytokine response. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, 2015.

SANTOS, Franciele Martins *et al.* Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007375, 2019.

SERRA, Otacília Pereira *et al.* Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.

SILVA, Milene Lopes da. Xantenodionas: síntese, aspectos teóricos, estruturais e avaliação das atividades fungicida e leishmanicida. 2017. 365f. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

SNYDER, Jonathan E. *et al.* Functional characterization of the alphavirus TF protein. **Journal of virology**, v. 87, n. 15, p. 8511-8523, 2013.

TAN, Yaw Sing *et al.* The use of chlorobenzene as a probe molecule in molecular dynamics simulations. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 7, p. 1821-1827, 2014.

TAPPE, Dennis *et al.* Sustained elevated cytokine levels during recovery phase of Mayaro Virus infection. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 4, p. 750, 2016.

TERZIAN, Ana Carolina B. *et al.* Isolation and characterization of Mayaro virus from a human in Acre, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 92, n. 2, p. 401-404, 2015.

VANEY, Marie-Christine; DUQUERROY, Stéphane; REY, Félix A. Alphavirus structure: activation for entry at the target cell surface. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 2, p. 151-158, 2013.

WAGGONER, Jesse J. *et al.* Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. **Journal of Clinical Virology**, v. 98, p. 1-4, 2018.

WANG, Eryu *et al.* Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4000-4008, 2006.

WEISE, William J. *et al.* A novel live-attenuated vaccine candidate for Mayaro Fever. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, 2014.

ZHANG, Rui *et al.* 4.4 Å cryo-EM structure of an enveloped alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus. **The EMBO journal**, v. 30, n. 18, p. 3854-3863, 2011.

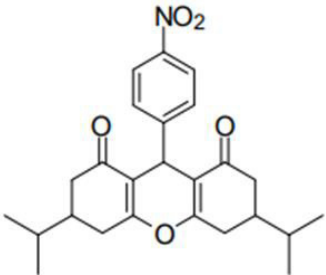
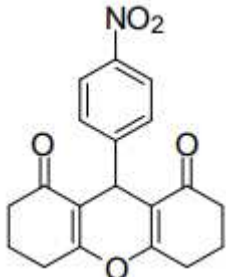
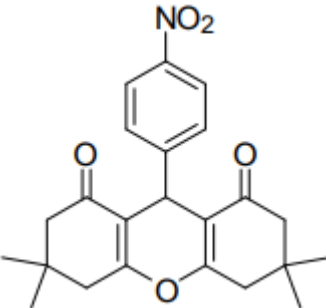
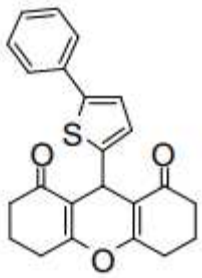
ZUCHI, Nayara *et al.* Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820-823, 2014.

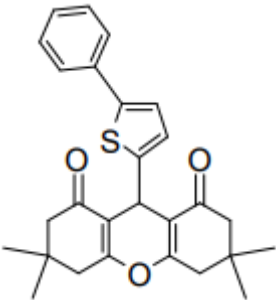
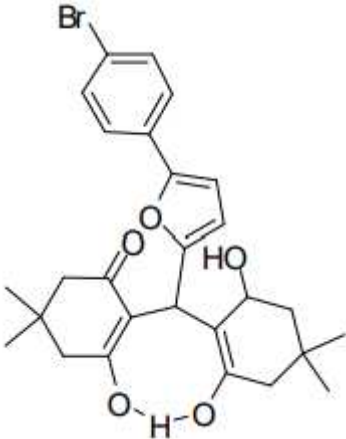
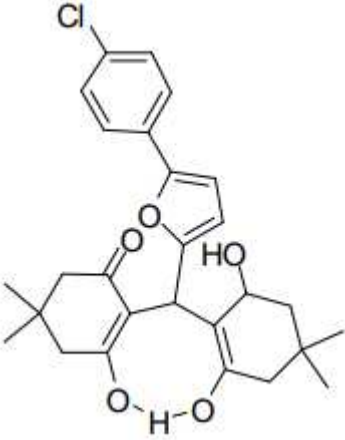
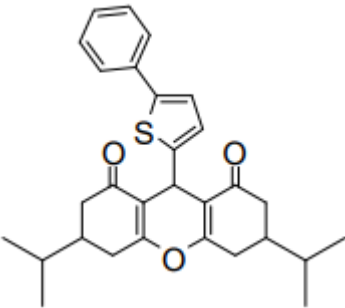
ANEXO I

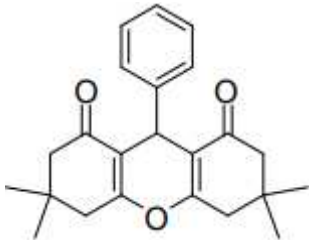
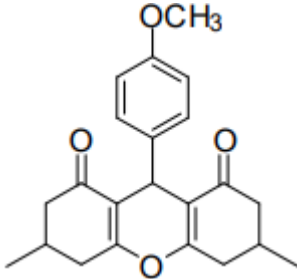
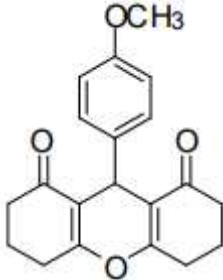
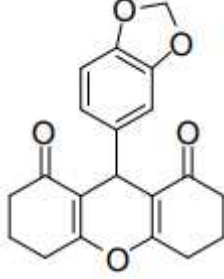
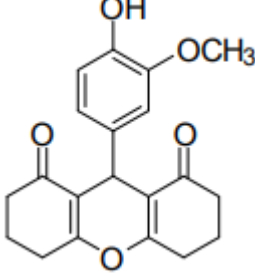
Tabela 1 – Citotoxicidade (CC₅₀) dos compostos xantenodionas 01 a 24 (DA SILVA *et al*, 2020).

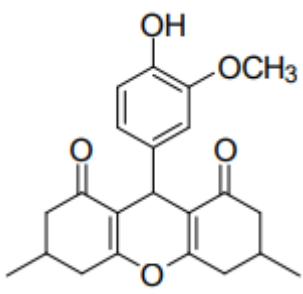
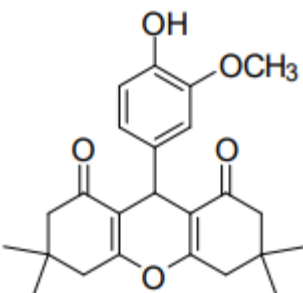
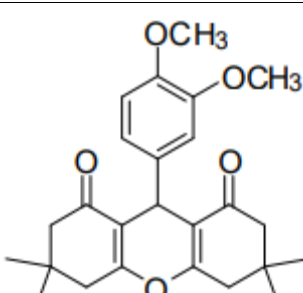
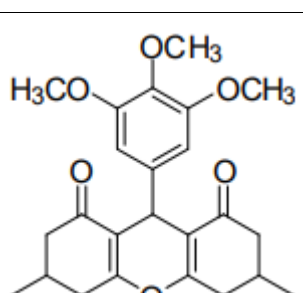
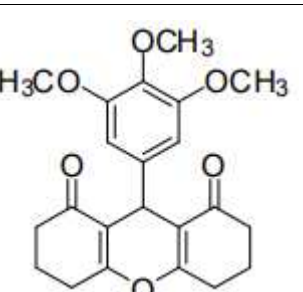
Composto	CC₅₀ (μM)	Composto	CC₅₀ (μM)	Composto	CC₅₀ (μM)
01	231,4	09	336,8	17	362
02	288	10	338,8	18	179,4
03	292,6	11	324,1	19	268,9
04	373	12	344,9	20	299,7
05	345,3	13	345,4	21	53,27
06	27,64	14	326,5	22	360,1
07	62,08	15	211,1	23	241,2
08	91,21	16	343,7	24	234,4

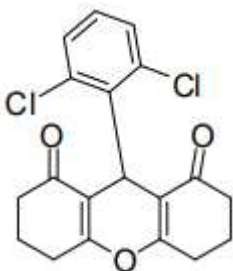
Tabela 3 – Códigos referentes aos compostos utilizados neste trabalho e sua correspondência no trabalho de Silva (2017).

CÓDIGO	CÓDIGO CORRESPONDENTE	ESTRUTURA
01	56	
02	7	
03	43	
04	17	

05	49	 Chemical structure of a tricyclic compound. It features a central oxygen atom bridged by two carbonyl groups. The carbonyl groups are part of a bicyclic system with two methyl groups on each ring. A phenylthio group (-S-C₆H₅) is attached to the central carbon atom.
06	34	 Chemical structure of a complex polycyclic compound. It features a central oxygen atom bridged by two carbonyl groups. The carbonyl groups are part of a bicyclic system with two methyl groups on each ring. A bromophenyl group (-C₆H₄-Br) is attached to the central carbon atom. The structure also includes a hydroxyl group (-OH) and a hydrogen bond (O-H-O) within the polycyclic framework.
07	33	 Chemical structure of a complex polycyclic compound. It features a central oxygen atom bridged by two carbonyl groups. The carbonyl groups are part of a bicyclic system with two methyl groups on each ring. A chlorophenyl group (-C₆H₄-Cl) is attached to the central carbon atom. The structure also includes a hydroxyl group (-OH) and a hydrogen bond (O-H-O) within the polycyclic framework.
08	58	 Chemical structure of a tricyclic compound. It features a central oxygen atom bridged by two carbonyl groups. The carbonyl groups are part of a bicyclic system with two isopropyl groups on each ring. A phenylthio group (-S-C₆H₅) is attached to the central carbon atom.

14	37	 Chemical structure of a bis-cyclohexanone derivative. It features two cyclohexanone rings connected at their 2-positions by a central carbon atom, which is also bonded to a phenyl group. The central carbon is also bonded to an oxygen atom at the 1-position of the central ring, forming a spirocyclic system.
15	25	 Chemical structure of a bis-cyclohexanone derivative. It features two cyclohexanone rings connected at their 2-positions by a central carbon atom, which is also bonded to a 4-methoxyphenyl group. The central carbon is also bonded to an oxygen atom at the 1-position of the central ring, forming a spirocyclic system.
16	9	 Chemical structure of a bis-cyclohexanone derivative. It features two cyclohexanone rings connected at their 2-positions by a central carbon atom, which is also bonded to a 4-methoxyphenyl group. The central carbon is also bonded to an oxygen atom at the 1-position of the central ring, forming a spirocyclic system.
17	14	 Chemical structure of a bis-cyclohexanone derivative. It features two cyclohexanone rings connected at their 2-positions by a central carbon atom, which is also bonded to a 1,3-dioxolane ring. The central carbon is also bonded to an oxygen atom at the 1-position of the central ring, forming a spirocyclic system.
18	13	 Chemical structure of a bis-cyclohexanone derivative. It features two cyclohexanone rings connected at their 2-positions by a central carbon atom, which is also bonded to a 3-methoxy-4-hydroxyphenyl group. The central carbon is also bonded to an oxygen atom at the 1-position of the central ring, forming a spirocyclic system.

19	28	
20	47	
21	45	
22	26	
23	11	

24	74	 <chem>Clc1cc(Cl)ccc1C2=C(Cl)C(=O)C3=CC=CC=C3C2=O</chem>
----	----	--