



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MARCOS ROMÁRIO MATOS DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PRÓ-NUCLEOTÍDEOS
INIBIDORES DA POLIMERASE VIRAL E ANTAGONISTAS DE EIF4E CONTRA OS
VÍRUS ZIKA, DENGUE E SARS-COV-2 E O REDIRECIONAMENTO DO EFAVIRENZ
PARA O TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2

RIO DE JANEIRO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Marcos Romário Matos de Souza

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PRÓ-NUCLEOTÍDEOS
INIBIDORES DA POLIMERASE VIRAL E ANTAGONISTAS DE EIF4E CONTRA OS
VÍRUS ZIKA, DENGUE E SARS-COV-2 E O REDIRECIONAMENTO DO EFAVIRENZ
PARA O TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana Jesus da Costa

RIO DE JANEIRO

2021

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão à Profa. Luciana Costa, minha orientadora, que me acolheu desde o mestrado e acreditou no meu trabalho. Obrigado por todo ensinamento, pela paciência, por ser exemplo de profissional e ser humano.

À revisora, Iranaia Miranda, pelas contribuições dadas ao trabalho, pelo seu tempo, empenho e prestatividade. É gratificante trabalhar com profissionais como você e o seu grupo.

À Luciana Arruda, obrigado por estar sempre disponível para nos ajudar no laboratório. Aprendo muito com nossas conversas e é muito dividir o laboratório com você e seus alunos.

Estendo meus agradecimentos a todos os membros do Laboratório de Genética e Imunologia das Infecções Virais, meus colegas de trabalho e meus amigos. Obrigado por terem me recebido tão bem e me fazerem sentir pertencente ao grupo e ao lab.

Em especial, agradeço a quem ajudou diretamente nos experimentos para a realização desse trabalho e trabalharam incansavelmente desde o início da pandemia, sem os quais essa tese não seria possível: Gustavo Peixoto, Isadora Alonso, Bruno Braz, Pedro Calil, Sharton Coelho, Vinícius Wakkof. Muito obrigado!

Muito obrigado aos coautores dos artigos publicados ao longo do doutorado, em especial Fábio Monteiro, pela ajuda essencial nos experimentos *in vivo* de ZIKV.

I would like to thank Dr. Wagner, Dr. Alex Strom, Max Dillenburg, and Dr. Ozgun Kilic from the University of Minnesota for all the support, teaching and overall, the lessons I have learnt while we were working.

Nisha Vishwanatthan, even if I knew how to speak five or six languages like you do it wouldn't be enough to express how grateful I am for having met you. Undoubtedly you were the best thing Minnesota brought to me and I want to be forever with you because you were there for me in my ups and downs, and one should never forget a friend who offers you a hand when you need it the most. I love you. You changed me. *Om Sai Namoh Namah!*

Juliana Spinosa, Naiara Ximenes, Manuel Alves, Davi Damasceno e Karine Lima, muito obrigado por terem acreditado em mim e me incentivado a seguir na pesquisa desde a graduação. Obrigado por estarem sempre comigo, ainda que longe. A amizade de vocês é essencial para mim. Amo-os muito.

Tamara e Yasmin, obrigado por todo o apoio desde o mestrado. Trabalhar com vocês foi uma honra para mim. Tenho sorte de ter amigas tão maravilhosas como vocês. Jamais esquecerei a mão estendida quando mais precisei. Amo vocês.

Aos amigos que fiz no Rio de Janeiro e que me receberam de braços e coração abertos, vocês são minha alegria e me fizeram enxergar um Romário para além do pesquisador. Sou muito grato por conhecer cada um de vocês. Obrigado por me fazerem feliz, pelo apoio, por me ouvir reclamar da tese e dos ranços. Eu não sei o que vai acontecer em seguida, mas é certo que levo vocês para sempre. Simone, Dani, Tati, Vitor, Bella, Antônio e Marcelo, tem um poema de António Ramos Rosa que fala muito da amizade para mim: “Para um amigo tenho sempre um relógio esquecido em qualquer fundo de algibeira / Mas esse relógio não marca o tempo inútil/ São restos de tabaco e de uma ternura rápida/ É um arco-íris de sombra, quente e trêmulo/ É um copo de vinho com o meu sangue e o sol.”

À minha família, minha base, meus amigos. Sou muito grato por ter vocês. Obrigado pela torcida de sempre, por acreditarem e por sonharem meus sonhos comigo.

Aos meus avós José Firmiano e Maria de Fátima, gratidão por terem, literalmente, desde o início de tudo, me acolhido, me cuidado, criado, educado e incentivado aos estudos. Vô, obrigado por todos os poemas, pela coleção de moedas e células antigas e peixeiras. Vó, obrigado pelo amor de mãe que a Sra tem por mim. Eu te amo de volta, como um filho.

Sérgio, obrigado por me receber e por fazer com que sua casa se tornasse um lar para mim. Eu sei que posso sempre voltar, sempre contar, sempre estar aí. E o seu amor, carinho e amizade impactam diretamente na qualidade do meu trabalho. Gratidão.

Mãe, quando olho para mim e vejo que estou me tornando quem eu sempre quis ser, eu vejo o quanto a Sra. participa de tudo isso. Lembra de quando a gente sonhou junto tudo o que estamos vivendo agora? Admiro, tenho orgulho e amo você (hoje e todos os dias). Obrigado por tudo. A conquista é nossa sempre.

*“Why should a man climb Everest?
Because it is there.”*

-George Mallory (1886-1924)

À minha avó, Raimunda Vânia (in memoriam),
meu amor e gratidão eternos.

DE SOUZA, Marcos Romário Matos. Caracterização da atividade antiviral de pró-nucleotídeos inibidores da polimerase viral e antagonistas de eIF4E contra os vírus Zika, dengue e SARS-CoV-2 e o redirecionamento do Efavirenz para o tratamento da infecção por SARS-CoV-2.

O vírus da dengue (DENV) e o vírus Zika (ZIKV) são arbovírus membros do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. Possuem genoma de aproximadamente 11.000 pares de base, constituído de RNA de fita simples e polaridade positiva. DENV e ZIKV são vírus de elevada importância epidemiológica e se tornaram problema de saúde pública para os quais não temos ainda terapia antiviral licenciada. O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19 e responsável por uma pandemia global sem precedentes, pertence à família *Coronaviridae* do gênero *Betacoronaviruse* possui como genoma uma molécula de RNA não segmentado de polaridade positiva. Até o momento, o único medicamento aprovado para uso emergencial, Remdesivir, tem uso restrito à administração intravenosa apenas para pacientes internados com as formas mais graves da doença, estando indisponível para a maioria dos infectados. O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antiviral dos compostos pró-nucleotídeos (ProTides) inibidores da polimerase viral UMN-1001, UMN-1002 e o análogo de nucleosídeo parental 2'-C-β-Metilguanossina contra ZIKV e DENV. Investigar a atividade antiviral dos compostos pró-nucleotídeos antagonistas de eIF4E, 4Ei-10 e 4Ei-11, contra ZIKV e SARS-CoV-2 e investigar a potencial atividade do Efavirenz contra SARS-CoV-2. A inibição da replicação de DENV pelo composto UMN-1002 foi 5 vezes maior que a do 2'-C-β-Metilguanossina em células Vero e HBMEC sem apresentar toxicidade aparente. Demonstramos que a atividade antiviral dos ProTides UMN-1001 e UMN-1002 se correlaciona com a atividade de Hint1. Juntos, esses dados demonstram que é possível sintetizar um pró-nucleotídeo fosforamido ativado por reação inicial não enzimática baseado na assistência anquimérica. Os compostos UMN-1001, UMN-1002 e 2'-C-β-Metilguanossina foram testados em linhagens de células epiteliais e neuronais e em um modelo de infecção *in vivo* com ZIKV utilizando camundongos selvagens neonatos. Todos os compostos foram capazes de reduzir significativamente a replicação de ZIKV e apresentaram segurança e eficácia *in vitro*. O tratamento com UMN-1001 e 2'-C-β-Metilguanossina apresentaram toxicidade *in vivo*, porém o tratamento com UMN-1002 reduziu aproximadamente 80% a replicação de ZIKV no cérebro e mais de 90% no tecido ocular dos camundongos infectados. Coletivamente, esses dados sugerem que UMN-1002 tem potencial para ser um antiviral de ação direta para o tratamento da infecção aguda pelo ZIKV e, embora esses compostos tenham apresentado segurança e eficácia *in vitro*, é necessário confirmar os dados de segurança em animais. O tratamento com 4Ei-11 reduziu significativamente a replicação do ZIKV em células SH-Sy5y (neuronais), enquanto o tratamento com 4Ei-10 e 4Ei-11 reduziu significativamente a replicação de SARS-CoV-2 em células epiteliais de pulmão humano (Calu-3), chegando a inibir completamente a quantidade de partículas virais infecciosas liberadas. Esses resultados demonstram que tanto ZIKV quanto SARS-CoV-2 dependem da via dependente de cap para a síntese de suas proteínas e que essa pode ser uma via do hospedeiro humano a ser explorada para o desenvolvimento de antivirais de ação indireta. O tratamento com Efavirenz reduziu significativamente a replicação de SARS-CoV-2 em linhagens celulares relevantes à patogênese da infecção, reduzindo expressivamente também a quantidade de proteínas virais expressas nos lisados de células Vero E6 e Calu-3 infectadas. O EFV apresentou valor de EC₅₀ superior ao do Remdesivir, atual tratamento disponível para COVID-19, demonstrando o potencial uso desse medicamento no tratamento da infecção por SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Zika, Dengue, SARS-CoV-2, Efavirenz, Antivirais

DE SOUZA, Marcos Romário Matos. Characterization of the antiviral activity of pronucleotide inhibitors of viral polymerase and antagonists of eIF4E against Zika, dengue and SARS-CoV-2 and the repurposing of Efavirenz for the treatment of the infection by SARS-CoV-2

Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses are arboviruses belonging to *Flavivirus* genus within the *Flaviviridae* family. These viruses present a 11 Kb positive polarity RNA as the genome. DENV and ZIKV have high epidemiology relevance and became a public health problem for which there is no specific and licensed antiviral therapy. SARS-CoV-2, the etiological agent of COVID-19 and responsible for a global pandemic without precedents, belongs to the *Coronaviridae* family and *Betacoronavirus* genus and present as genome a single stranded RNA molecule of positive polarity. Until now, Remdesivir is the only drug approved for emergency use in the treatment of COVID-19, however Remdesivir can only be administered via intravenous and only in hospitalized patients with the severe forms of the disease, thus being unavailable for most of the infected individuals. The aim of this work was to investigate the antiviral activity of the pronucleotide (ProTide) compounds UMN-1001, UMN-1002 and the parental nucleoside 2'-C- β -Methylguanosine against ZIKV and DENV. To investigate the antiviral activity of ProTides antagonists of eIF4E, 4Ei-10 and 4Ei-11, against ZIKV and SARS-CoV-2 and to investigate the potential antiviral activity of Efavirenz against SARS-CoV-2. Inhibition of DENV replication by UMN-1002 was 5-fold greater than 2'-C- β -Methylguanosine in Vero and HBMEC cells without apparent toxicity. We demonstrated that the antiviral activity of UMN-1001 and UMN-1002 correlates with Hint1 activity. Together, these data show that it is possible to synthesize a pronucleotide phosphoramidate based activated initially by a non-enzymatic reaction step by anchimeric assistance. UMN-1001, UMN-1002, and 2'-C- β -Methylguanosine were screened in epithelial and neuronal cell lines and using an *in vivo* model of ZIKV infection using neonates wild-type mice. All compounds were capable of significantly reduce ZIKV replication while presenting safety and efficacy *in vitro*. Treatment with UMN-1001 and 2'-C- β -Methylguanosine was toxic *in vivo*, however treatment with UMN-1002 reduced approximately 80% of ZIKV replication in brain and more than 90% in eye tissue. Collectively, these data suggest that UMN-1002 has potential to be a direct-acting antiviral for the treatment of ZIKV acute infection, and even though these compounds have presented safety and efficacy *in vitro* it is necessary to further investigate their safety towards animals. Treatment with 4Ei-11 significantly reduced ZIKV replication in SH-Sy5y (neuronal cells), while treatment with 4Ei-10 and 4Ei-11 significantly reduced SARS-CoV-2 replication in human lung epithelial cells (Calu-3), reaching complete inhibition of infectious virus particles released from infected cells. These results demonstrate that ZIKV and SARS-CoV-2 rely on the cap-dependent pathway to synthesize their proteins and this pathway can be an interesting target for the development of indirect-acting antivirals. Treatment with Efavirenz significantly reduced SARS-CoV-2 replication in cell lines relevant for this virus pathogenesis, markedly reducing the amount the viral protein expressed in the infected Vero E6 and Calu-3 lysates. EFV present higher EC₅₀ value compared to Remdesivir, the only available treatment for COVID-19, thus showing the potential of this drug for the treatment of the infection by SARS-CoV-2.

Keywords: Zika, Dengue, SARS-CoV-2, Efavirenz, Antivirals

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES PRESENTES NOS ISOLADOS DE SARS-CoV-2 UTILIZADOS NO ESTUDO	56
TABELA 2 CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E TEMPO PARA OBTENÇÃO DO CDNA	67
TABELA 3 CICLAGEM DA PCR EM TEMPO REAL PARA DENV E ZIKV	67
TABELA 4 SEQUÊNCIA DE INICIADORES E SONDAS UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL	69
TABELA 5 SEQUÊNCIA DE INICIADORES E SONDA UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DO RNAsG* DO SARS-CoV-2.....	71
TABELA 6 PARÂMETROS FARMACOLÓGICOS DOS PROTÍDES INIBIDORES DA POLIMERASE VIRAL CONTRA DENV2 IN VITRO	80
TABELA 7 PARÂMETROS FARMACOLÓGICOS DOS PROTÍDES INIBIDORES DA POLIMERASE VIRAL CONTRA ZIKV IN VITRO.....	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ENTRADA E METABOLISMO INTRACELULAR DE ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEO	17
FIGURA 2 MECANISMO DE ATIVAÇÃO INTRACELULAR DO CAH-PROTIDE	20
FIGURA 3 MECANISMO DE ATIVAÇÃO INTRACELULAR DOS PROTIDES UMN-1002 E UMN-1001.....	21
FIGURA 4 ESTRUTURA QUÍMICA DOS PROTIDES UMN-1001, UMN-1002 E O ANÁLOGO DE NUCLEOSÍDEO 2'-C-B-METILGUANOSINA....	22
FIGURA 5 ESTRUTURA QUÍMICA E MECANISMO DE ATIVAÇÃO INTRACELULAR DOS AHA-PROTIDES 4Ei-10 E 4Ei-11	26
FIGURA 6 ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EFAVIRENZ CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA.....	29
FIGURA 7 A PARTÍCULA VIRAL DOS FLAVIVÍRUS.....	31
FIGURA 8 REPRESENTAÇÃO LINEAR DO GENOMA E DA POLIPROTEÍNA DOS FLAVIVÍRUS	32
FIGURA 9 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO REPLICATIVO DOS FLAVIVÍRUS.	34
FIGURA 10 CICLO REPLICATIVO DOS CORONAVIRUS.....	45
FIGURA 11 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DOS PRÓ-FÁRMACOS INIBIDORES DA POLIMERASE VIRAL E INIBIDOR FARMACOLÓGICO DE HINT1...77	77
FIGURA 12 ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS PRÓ-FÁRMACOS INIBIDORES DA POLIMERASE VIRAL CONTRA DENV-2 E O PAPEL DE HINT1 NA ATIVAÇÃO DOS PROTIDES.....	79
FIGURA 13 ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS PRÓ-FÁRMACOS INIBIDORES DA POLIMERASE VIRAL CONTRA ZIKV.	82
FIGURA 14 ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS PROTIDES INIBIDORES DA POLIMERASE E 2'-C-B-METILGUANOSINA NA REPLICAÇÃO DE GENOMA VIRAL.....	85
FIGURA 15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IN VIVO DOS PROTIDES INIBIDORES DA POLIMERASE E 2'-C-B-METILGUANOSINA.	89
FIGURA 16 PERFIL DE TOXICIDADE CELULAR DOS PROTIDES 4Ei-10 E 4Ei-11.....	90
FIGURE 17 ATIVIDADE ANTIVIRAL DO PROTIDE 4Ei-11 CONTRA ZIKV EM CÉLULAS HEK 293 E SH-Sy5Y.....	92
FIGURE 18 ATIVIDADE DO PROTIDE 4Ei-10 CONTRA SARS-CoV-2 EM CÉLULAS CALU-3.....	94
FIGURA 19 ATIVIDADE DO PROTIDE 4Ei-11 CONTRA SARS-CoV-2 EM CÉLULAS CALU-3.....	95
FIGURA 20 MICROSCOPIA CONFOCAL PARA VISUALIZAÇÃO DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-CoV-2 E DO RNADF EM CÉLULAS CALU-3 TRATADAS COM 4Ei-10.....	96
FIGURA 21 MICROSCOPIA CONFOCAL PARA VISUALIZAÇÃO DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-CoV-2 E DO RNADF EM CÉLULAS CALU-3 TRATADAS COM 4Ei-11.....	97
FIGURA 22 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EFAVIRENZ EM CÉLULAS HUH-7	99
FIGURA 23 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EFAVIRENZ EM CÉLULAS VERO E6.....	101
FIGURA 24 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EFAVIRENZ EM CÉLULAS CALU-3.....	105
FIGURA 25 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EFAVIRENZ EM CÉLULAS THP-1 E MONÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA- Aminoácidos
cDNA- DNA complementar
CHIKV – Vírus chikungunya
COVID-19 – *Coronavirus-induced disease 2019*
DC-SIGN - *Dendritic-cell specific ICAM-3-grabbing non integrin*
DENV – Vírus da dengue
DENV 1- Sorotipo 1 do vírus da dengue
DENV 2- Sorotipo 2 do vírus da dengue
DENV3- Sorotipo 3 do vírus da dengue
DENV4- Sorotipo 4 do vírus da dengue
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – *Desoxiribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucleico
EFV – Efavirenz
FcγR – Receptor para a fração c de imunoglobulina G
HCV – Vírus da Hepatite C
HINT1 – *HistidineTriadNucleotidebindingprotein 1*, Proteína 1 ligante de nucleotídeo tríade de histidina
IFN - Interferon
IFN- I – Interferon do tipo I
IFN- III – Interferon do tipo III
Kb- Kilobase
ml- Mililitros
NC - Nucleocapsídeo
NSP – *Nonstructuralprotein*, Proteína não estrutural
ORF – *Open reading frame*, Janela aberta de leitura
PAMP – do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*, Padrão molecular associado a patógenos
PCR – *Polymerase Chain Reaction*, Reação em cadeia da polimerase
PFU – *Plaque forming units*, Unidades formadoras de placa
PRR- do inglês *Patternrecognitionreceptors*, Receptores de reconhecimento de padrões
qPCR – *QuantitativePolymerase Chain Reaction*, Reação em cadeia da polimerase quantitativo
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RdRp – RNA-dependente RNA-polimerase
RE – Retículo endoplasmático
RNA – *Ribonucleic acid*, Ácido ribonucleico
RNAdf – RNA de dupla fita
RNAm – RNA mensageiro
RNAsg – RNA subgenômico
SARS-CoV-2 – vírus da síndrome respiratória aguda grave do tipo 2
sfRNA- *Subgenomic Flavivirus RNA*, RNA subgenômico de *Flavivirus*
SGB – Síndrome de Guillain-Barré
SNC – Sistema Nervoso Central
UMN-1001- 2'C-β-Metilguanositriptaminafosforamidatomoéster
UMN-1002- 2'C-β-Metilguanositriptaminafosforamidatodiéster
UTR- *UntranslatedRegion*, Região não traduzida
ZIKV- Vírus Zika
ZIKV-BR_{PE}- Cepa do vírus Zika isolada de paciente de Pernambuco, Brasil
μl- Microlitros
μM–Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Análogos de nucleosídeos e pró-nucleotídeos com atividade antiviral	15
1.2 O redirecionamento de fármacos	26
1.3 Os Flavivirus: Estrutura, organização genômica e estratégia de replicação	30
1.4 O vírus da dengue	35
1.4.1 A infecção pelo vírus da dengue.....	36
1.5 O vírus Zika	37
1.5.1 A infecção pelo vírus Zika.....	39
1.6. O controle da infecção pelo vírus da dengue e vírus Zika	40
1.7 Coronavírus e o SARS-CoV-2	41
1.7.1 A COVID-19.....	46
2 JUSTIFICATIVA	48
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Culturas de células	52
4.2 Isolamento de monócitos humanos	53
4.3 Vírus	54
4.3.1 Vírus da dengue e Zika vírus	54
4.3.2 SARS-CoV-2	54
4.4 Ensaio de formação de placa	57
4.4.1 Titulação da partícula viral infecciosa de DENV2	57
4.4.2 Titulação da partícula viral infecciosa de ZIKV.....	57
4.4.3 Titulação da partícula viral infecciosa de SARS-CoV-2	58
4.4 Infecção das células	59
4.4.1 Infecção com DENV e ZIKV	59
4.4.2 Infecção com SARS-CoV-2.....	59
4.5 Drogas	60
4.6 Ensaio de citotoxicidade	61
4.7 Avaliação da atividade antiviral	62
4.7.1 Atividade antiviral dos ProTides inibidores da polimerase viral contra DENV e ZIKV	62
4.7.2 Avaliação do papel de Hint1 na ativação dos ProTides UMN-1001 e UMN-1002	63
4.7.3 Atividade antiviral dos ProTides inibidores da iniciação da tradução via cap-dependente contra ZIKV e SARS-CoV-2	63
4.7.4 Atividade antiviral do Efavirenz contra SARS-CoV-2.....	64
4.8 Síntese de cDNA e qPCR para os experimentos com DENV e ZIKV	65

4.9 Síntese de cDNA e qPCR para os experimentos in vitro com SARS-CoV-2	70
4.10 Detecção do RNA subgenômico do SARS-CoV-2 por RT-qPCR	70
*RNAsg= RNA subgenômico	71
4.11 Curvas concentração-efeito e determinação de EC₅₀.....	71
4.12 Imunofluorescência	72
4.13 Western blot.....	73
4.14 Experimentos in vivo	73
4.15 Análise estatística	74
5 RESULTADOS.....	76
5.1. Avaliação da atividade antiviral dos ProTides inibidores da polimerase viral contra DENV e ZIKV	76
5.1.1 Determinação da citotoxicidade dos compostos	76
5.1.2 Inibição da replicação de DENV2 e o papel de Hint1 na ativação dos ProTides UMN-1001 e UMN-1002	77
5.1.3 Inibição da replicação de ZIKV pelos ProTides inibidores da polimerase viral in vitro.....	80
5.1.4 Inibição da replicação de ZIKV pelos ProTides inibidores da polimerase viral in vivo	86
5.2. Atividade antiviral dos ProTides inibidores da iniciação da tradução via cap-dependente contra ZIKV e SARS-CoV-2	89
5.2.1. Determinação da citotoxicidade de 4Ei-10 e 4Ei-11	89
5.2.2. Atividade antiviral do ProTide 4Ei-11 contra ZIKV	91
5.2.3. Atividade antiviral dos ProTides 4E-10 e 4Ei-11 contra SARS-CoV-2.....	92
5.3 Atividade anti-SARS-CoV-2 do Efavirenz	97
6 DISCUSSÃO.....	107
7 CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS	123
ANEXO I.....	136
ANEXO II	137

1 INTRODUÇÃO

O primeiro medicamento aprovado para o tratamento de uma infecção viral foi a Idoxuridina, um análogo de nucleosídeo aprovado em 1963 e indicado para o tratamento de lesões na pele causadas pela infecção pelo vírus herpes simplex 1 (HSV-1) (KAUFMAN, 1962). Nas duas décadas seguintes, o desenvolvimento de medicamentos antivirais andou a passos lentos, com alguns avanços na terapia das infecções pelo vírus da Hepatite B (HBV) e C (HCV), mas a partir da descoberta do HIV-1, em 1983, as pesquisas de desenvolvimento de antivirais deu um salto considerável com a aprovação dos primeiros antirretrovirais (BRYAN-MARRUGO et al., 2015).

Atualmente, contamos com um repertório de aproximadamente 100 medicamentos antivirais aprovados e disponíveis no mercado para o tratamento das infecções por HIV, HBV, HCV, HSV, vírus da influenza, citomegalovírus humano e vírus da varicela zoster (DE CLERCQ; LI, 2016a). Apesar dos avanços na pesquisa com antivirais, principalmente depois do advento da terapia anti-HIV, nós ainda temos um arsenal terapêutico limitado tendo em vista a grande quantidade de vírus com capacidade de infectar e causar doenças em humanos.

Os medicamentos antivirais podem ser divididos em: antivirais de ação direta (AAD), aqueles que atuam especificamente sobre uma proteína específica do vírus, e os antivirais de ação indireta (AAI), que têm como alvo uma proteína ou via de sinalização do hospedeiro e não o vírus em si. As duas abordagens apresentam vantagens e desvantagens, um AAD, por ter como alvo um componente viral, tem um perfil de toxicidade menor contra o hospedeiro e essa seletividade traz mais segurança quando se trata de uma infecção crônica, onde o paciente vai ser exposto por muito tempo à droga, porém por ser vírus-específico, dificilmente poderá ser empregado como terapia de amplo espectro. Por outro lado, um AAI pode atuar em uma via de sinalização que é importante para a replicação de mais de um vírus, por tanto, com maior potencial de ser um antiviral de amplo espectro, entretanto como o alvo do AAI é o hospedeiro, o perfil de segurança e toxicidade deve ser considerado (BRYAN-MARRUGO et al., 2015; CHITALIA; MUNAWAR, 2020).

Uma abordagem mais recente no desenvolvimento de novas terapias, é o redirecionamento de fármacos, onde um medicamento aprovado inicialmente para uma determinada condição clínica, é direcionado para o tratamento de uma nova condição não relacionada à primeira. Uma das principais vantagens dessa abordagem é a expressiva redução no tempo e no custo para a aprovação da terapia na clínica, além de ser segura, uma vez que já se conhece o perfil de eficácia, efetividade e segurança do fármaco para uso em humanos (KUMAR et al., 2020a).

Nesta tese, investigamos novas opções de tratamento para a infecção pelos vírus da dengue, Zika e SARS-CoV-2, através das abordagens de AAD, AAI e redirecionamento de fármacos.

1.1 Análogos de nucleosídeos e pró-nucleotídeos com atividade antiviral

A observação da atividade antiviral dos análogos de nucleosídeos, que foram inicialmente desenvolvimentos para o tratamento do câncer, representa um marco no campo da pesquisa antiviral (DE CLERCQ, 2012). Os análogos de nucleosídeo/nucleotídeo são pró-fármacos, uma vez que são farmacologicamente inativos, precisando passar por transformação enzimática ou química para gerar sua forma ativa com efeito farmacológico (RAUTIO et al., 2008). Atualmente, existem mais de 25 fármacos análogos de nucleosídeo/nucleotídeo com uso na clínica como antivirais para infecções pelos vírus da hepatite C (HCV), herpes (HSV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CHEN; YOKOKAWA; SHI, 2015; JORDHEIM et al., 2013).

Os nucleosídeos/nucleotídeos sintéticos atuam como antimetabólitos através das mesmas vias metabólicas que os nucleosídeos endógenos. Esses compostos têm acesso ao citoplasma através dos receptores específicos de nucleosídeos (CANO-SOLDADO; PASTOR-ANGLADA, 2012). Uma vez liberados no citoplasma, os análogos de nucleosídeos são sequencialmente fosforilados pelas enzimas nucleosídeo cinase, nucleosídeo monofosfato cinase e nucleosídeo difosfato cinase, respectivamente. Após o processo sequencial de fosforilação, há acúmulo

intracelular das formas di e trifosforiladas que são farmacologicamente ativas (**Figura 1**) (GALMARINI; MACKEY; DUMONTET, 2001; YATES; SELEY-RADTKE, 2019).

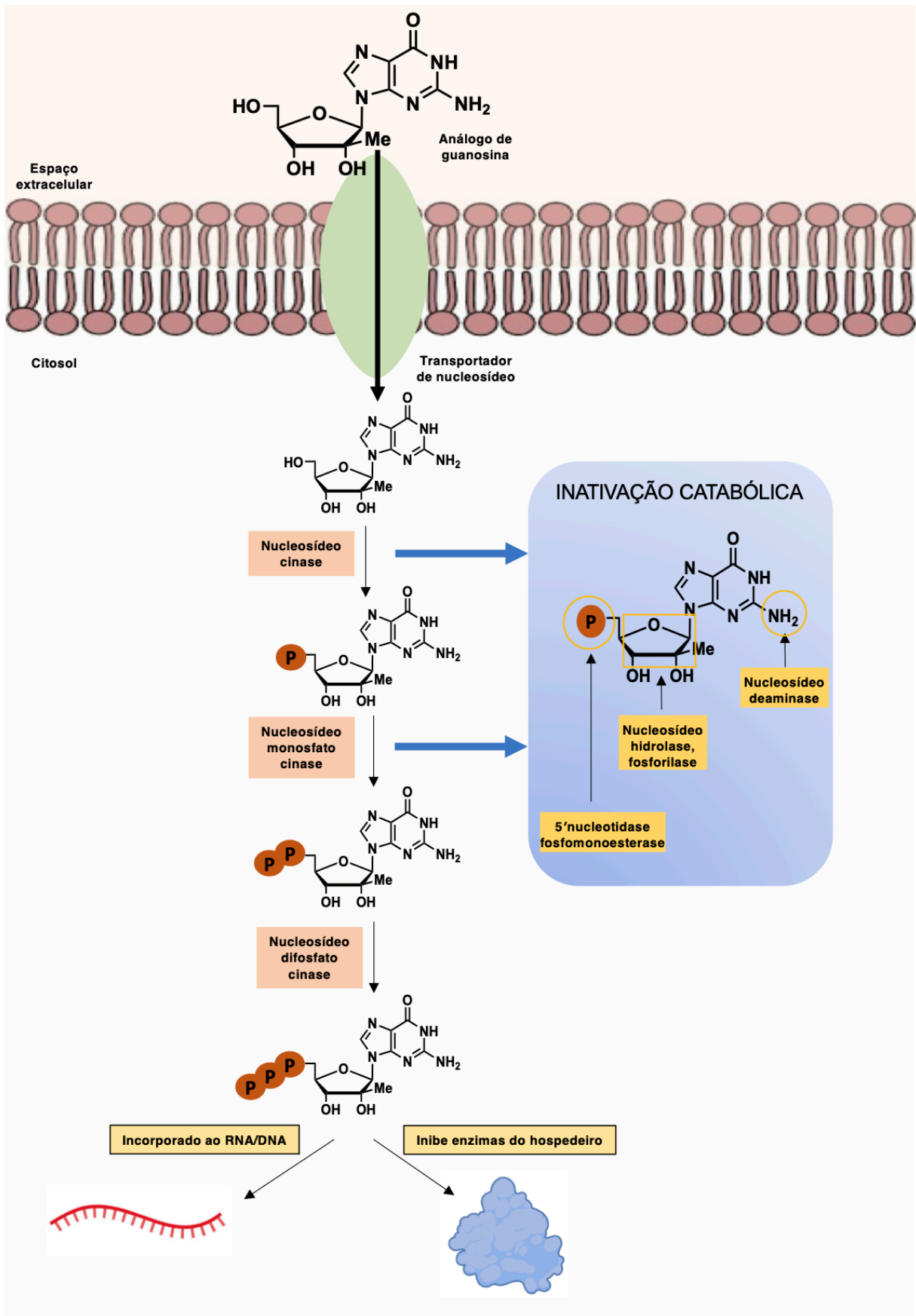


Figura 1 Entrada e metabolismo intracelular de análogos de nucleosídeo Os análogos de nucleosídeo (aqui representados por um análogo de guanósina) entram na célula através de transportadores específicos para nucleosídeos na membrana plasmática no citoplasma, os compostos são fosforilados por cinases de nucleosídeo celulares resultando na formação de nucleosídeos mono- di- e trifosfatados. A primeira fosforilação é a etapa limitante da conversão de um

análogo de nucleosídeo à sua forma trifosfatada. As formas trifosfatadas dos nucleosídeos representam a forma ativa dos análogos de nucleosídeo que atuam inibindo diretamente enzimas celulares ou virais como as RNA/DNA polimerases. Durante a replicação de RNA/DNA os análogos de nucleosídeo são incorporados às fitas nascentes de RNA/DNA resultando em terminação da síntese dos ácidos nucleicos ou em acúmulo de mutações em genomas virais o que pode interromper a replicação viral. Em condições fisiológicas normais, as concentrações intracelulares de nucleosídeos são mantidas em baixos níveis devido às vias catabólicas de nucleosídeo/nucleotídeo, como deaminação (oxidação) da base heterocíclica, hidrólise ou fosforólise da base heterocíclica e hidrólise da ligação fosfomonoéster (Adaptado de Jordheim et al., 2013).

As formas farmacologicamente ativas dos análogos de nucleosídeo/nucleotídeo podem atuar diretamente sobre enzimas virais, como as polimerases e proteases, bem como sobre enzimas celulares e fatores regulatórios de vias metabólicas do hospedeiro. No contexto de uma infecção viral, os análogos de nucleosídeos trifosfatados que são incorporados nas moléculas nascentes de DNA ou RNA virais, inibem as enzimas polimerases de DNA ou RNA virais e podem levar à terminação do processo de alongação da síntese dessas moléculas, ao acúmulo de mutações na progênie viral e à indução de apoptose da célula infectada (CHEN; YOKOKAWA; SHI, 2015; JORDHEIM et al., 2013).

Esforços significativos têm sido feito nos campos da química medicinal e da pesquisa antiviral para o desenvolvimento de análogos de nucleosídeos que tenham como alvo as polimerases virais. Particularmente, a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) tem se destacado como um alvo atrativo devido ao seu papel fundamental na síntese do genoma dos vírus de RNA (JORDHEIM et al., 2013; MIGLIACCIO et al., 2003). Tais esforços estabeleceram os análogos de nucleosídeos com uma modificação do tipo 2'-C- como um farmacóforo comum nos inibidores dessas polimerases. Especificamente, a modificação 2'-C-β-Metil (2'-C-β-Me) aparece como farmacóforo preferencial nessas moléculas (SIZUN et al., 2015). Esses inibidores nucleosídicos, previamente desenvolvidos para o tratamento da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), mostraram-se potentes inibidores do DENV devido a similaridades filogenéticas entre as suas respectivas RdRps (KOONIN; DOLJA; MORRIS, 1993; NG; ARNOLD; CAMERON, 2008a). Os inibidores nucleosídicos com a modificação 2'-C-β-Me mais potentes contra DENV são 2'-C-β-Metiladenosina e 2'-C-β-Metilguanossina, apresentando EC₅₀ de 4 μM e 13,6 μM, respectivamente (MIGLIACCIO et al., 2003).

Apesar do seu grande potencial, o uso de análogos de nucleosídeos para tratar infecções virais enfrenta limitações. Particularmente, a primeira fosforilação na via de ativação de um análogo de nucleosídeo é uma etapa limitante e que possui baixa eficiência *in vivo*, o que pode levar à redução da sua potência e causar acúmulo de intermediários citotóxicos (LUTZ; LIU; LIU, 2009; PERTUSATI; SERPI; MCGUIGAN, 2012). Uma estratégia para superar essa limitação é realizar a entrega do análogo de nucleosídeo já na sua forma monofosfatada na célula alvo, ou seja, como um nucleotídeo sintético. Entretanto, a natureza intrínseca da carga do grupamento fosfato, associado à polaridade do nucleotídeo na faixa fisiológica de pH e a presença de fosfatases humanas representam outros limitantes que comprometem o uso direto dos nucleosídeos monofosfatados, resultando em características farmacocinéticas e farmacodinâmicas insuficientes para alcançar a atividade esperada e que precisam ser otimizadas (LUTZ; LIU; LIU, 2009; VERNACHIO et al., 2011).

Novas estratégias têm sido desenvolvidas para otimizar a entrega dos análogos de nucleotídeos. Em geral, essas estratégias envolvem a incorporação de diferentes componentes químicos à molécula do análogo de nucleotídeo gerando pró-drogas, ou pró-nucleotídeos (ProTides, do inglês, *pronucleotide*), que possuem grupamento fosfato/fosfonato mascarados, estabilizados e protegidos pelos grupamentos químicos adicionados à molécula (CAHARD, 2004; SLUSARCZYK; SERPI; PERTUSATI, 2018; WAGNER; IYER; MCINTEE, 2000).

A síntese dos pró-nucleotídeos é uma das principais e mais bem estudadas tecnologias para o desenvolvimento de pró-drogas (SLUSARCZYK; SERPI; PERTUSATI, 2018). De maneira geral, a molécula de um ProTide passa pelo processo metabólico intracelular de ativação em quatro etapas, sofrendo inicialmente hidrólise mediada por carboxilesterases celulares, seguido de ataque nucleofílico mediado pelo ácido carboxílico sobre o átomo de fósforo com liberação de fenol, seguida por hidrólise química por anidrido misto e finalmente hidrólise enzimática da ligação entre os átomos de fósforo e nitrogênio (P-N) mediada pela fosforamidase intracelular Hint1 (do inglês, *histidinetriadnucleotidebindingprotein 1*) (**Figura 2**). Por tanto, esses compostos podem ser

denominados ProTides ativados por carboxilesterases, hidrólise química e Hint1 (CAH-ProTides, do inglês, *Carboxylesterase-anhydrade-Hint1*) (MURAKAMI et al., 2010).

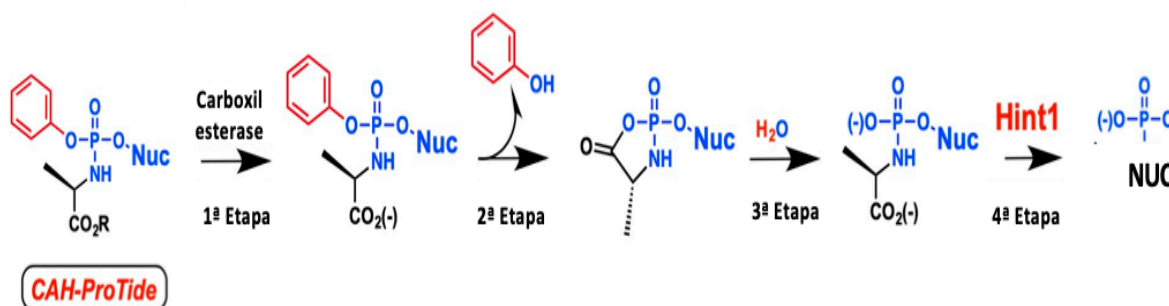


Figura 2 Mecanismo de ativação intracelular do CAH-ProTide Após atravessar a membrana plasmática, a molécula do CAH-ProTide passa por um processo de ativação em 4 etapas. Na primeira etapa, o ácido carboxílico sofre uma reação de hidrólise catalisada por carboxilesterases celulares. Na segunda etapa, o carbanion formado como resultado da hidrólise do ácido carboxílico realiza um ataque nucleofílico no átomo de fósforo liberando o grupamento fenol e promovendo circularização estrutural da molécula. Na terceira etapa, ocorre hidrólise do anidrido misto formado na segunda etapa. Na quarta e última etapa da ativação, a molécula sofre uma hidrólise enzimática na ligação entre os átomos de nitrogênio e fósforo catalisada pela fosforamidase intracelular Hint1, liberando o nucleosídeomonofosfatado, ou nucleotídeo.

Os CAH-ProTides são as pró-drogas mais promissoras atualmente para a entrega de nucleotídeos ao fígado devido à elevada atividade das carboxilesterases nesse tecido durante o metabolismo de primeira passagem (MCGUIGAN et al., 2010; MURAKAMI et al., 2010). Por exemplo, a concentração intra-hepática, em humanos, dos metabólitos totais de Sofosbuvir, um pró-fármaco CAH-ProTide análogo de uridina aprovado pela agência federal americana (FDA, do inglês, *Food and Drug Administration*) para o tratamento da infecção pelo HCV, é trinta vezes maior que a concentração plasmática após administração oral (BABUSIS et al., 2018). Esse direcionamento hepático pode impactar negativamente a eficiência da entrega da forma ativa do fármaco aos outros tecidos.

Para contornar essa limitação, o grupo liderado pelo Dr. Wagner, nosso colaborador na Universidade de Minnesota, EUA, desenvolveu uma estratégia alternativa para a síntese dos ProTides, gerando os ProTides ativados por assistência anquimérica e por Hint1 (AHA-ProTides). Esses compostos foram sintetizados através da incorporação de dois grupamentos para o mascaramento do átomo de fósforo: um grupamento triptamina fosforamidato, atuando como alvo

de Hint1 e uma porção (metiltio)alquil, ambos atuam como protetor do grupo funcional fosfato, aumentam a lipofilicidade e auxiliam na estabilidade da molécula (OKON et al., 2017a, 2017b). Ao contrário dos CAH-ProTides, a ativação intracelular de um AHA-ProTide depende de uma etapa química inicial mediada pela porção (metiltio)alquil, que sofre uma reação nucleofílica mediada pelo átomo de enxofre, denominada assistência anquimérica, com consequente liberação da molécula do análogo de nucleotídeo ainda com o grupamento triptamina fosforamidato, que é em seguida hidrolisado pela Hint1, liberando o análogo de nucleotídeo que será di e trifosforilado gerando a forma 5'-trifosfato do análogo de nucleotídeo, que é a sua forma farmacologicamente ativa (**Figura 3**) (OKON et al., 2017a).

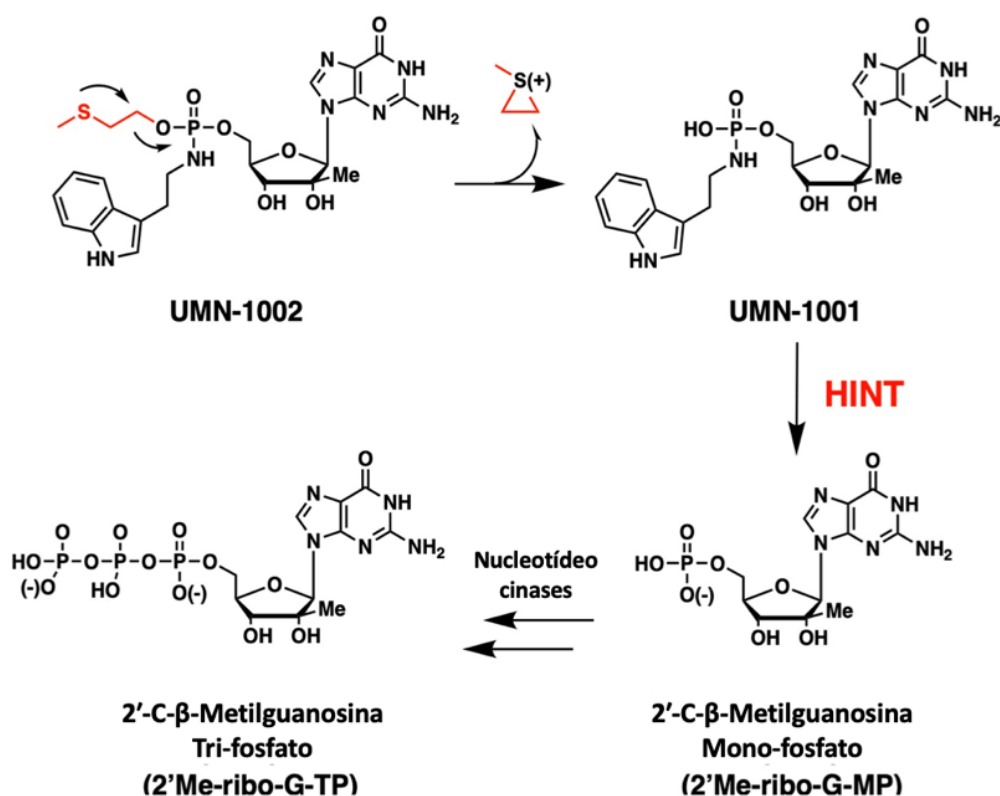


Figura 3 Mecanismo de ativação intracelular dos ProTides UMN-1002 e UMN-1001. Após atravessar a membrana plasmática, a molécula do UMN-1002 passa inicialmente por uma etapa química mediada pela porção (metiltio)alquil, que sofre uma reação nucleofílica mediada pelo átomo de enxofre, denominada assistência anquimérica, gerando o ProTide UMN-1001 que é, em seguida, hidrolisado pela fosforamidase Hint1 na ligação entre os átomos de nitrogênio e fósforo, liberando o análogo de guanossinomonofosfato que será, sequencialmente, di e trifosforilado por cinases intracelulares formando o análogo de guanossinotri-fosfato farmacologicamente ativo.

Como uma tentativa de otimizar a atividade anti-DENV do análogo de nucleosídeo 2'-C- β -metilguanossina (MIGLIACCIO et al., 2003), Wagner e colaboradores sintetizou um AHA-ProTide a partir de alterações químicas na molécula do análogo de nucleosídeo parental (2'-C- β -metilguanossina): UMN-1002 [2'-C- β -metilguanossina 2-(metiltio)etil triptamina fosforamidato diéster] e um ProTide UMN-1001 [2'-C- β -metilguanossina triptamina fosforamidato monoéster] (**Figura 4**). As modificações químicas realizadas no composto parental, referido como composto 1 neste trabalho, foram feitas objetivando melhorar as características farmacocinéticas através do aumento da lipofilicidade, permeabilidade celular e estabilidade da pró-droga.

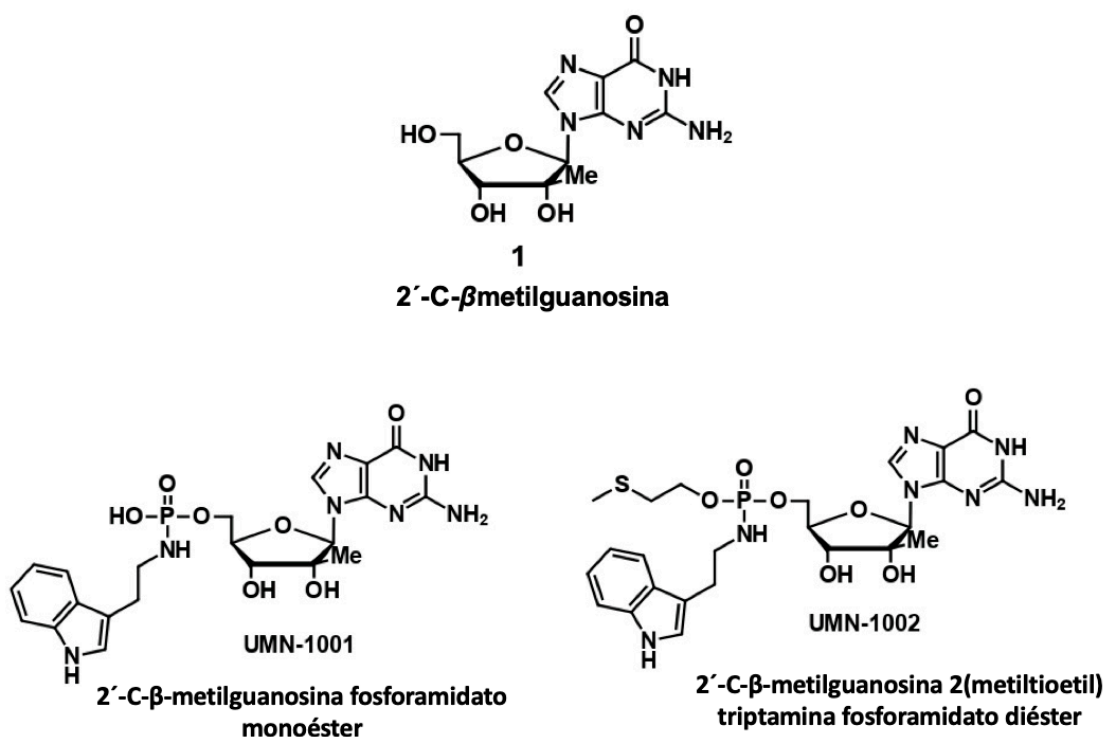


Figura 4 Estrutura química dos ProTides UMN-1001, UMN-1002 e o análogo de nucleosídeo 2'-C- β -metilguanossina. Os pró-nucleotídeos UMN-1001 e UMN-1002 foram sintetizados a partir de modificações químicas estruturais do análogo de nucleosídeo 1. As alterações foram realizadas para gerar um nucleosídeomonofosfatado com mascaramentos químicos do átomo de fósforo que conferem, além de proteção contra ação de fosfatases intracelulares e plasmáticas, aumento da lipofilicidade e estabilidade à molécula. No composto UMN-1001, o mascaramento do fósforo é feito pelo grupamento triptaminafosforamidatomonoéster. No composto UMN-1002, além do grupamento triptaminafosforamidato, foi adicionado um grupamento 2-(metiltio)etil, gerando um composto fosforamidatodiéster.

Uma vez na célula, o ProTide UMN-1002 é metabolizado gerando o UMN-1001, inicialmente passando por uma reação nucleofílica anquimérica através do seu grupamento 2-(metiltio)etil, promovendo a desproteção parcial do grupamento fosfato, seguido da clivagem da ligação entre P-N do grupamento triptaminafosforamidato pela enzima Hint1, enquanto UMN-1001 é ativado apenas por Hint1 (**Figura 3**).

Recentemente nós demonstramos que UMN-1001 e UMN-1002 tiveram aumento da atividade anti-DENV relativo ao análogo de nucleosídeo parental 1 *in vitro* (**Anexo I**) (OKON et al., 2017a). Além disso, também foi demonstrado que os AHA-ProTides são biodisponíveis por via oral, possuem boa permeabilidade celular e dependem da Hint1 para hidrólise do grupamento fosforamidato (OKON et al., 2017a, 2017b). Devido às similaridades estruturais, funcionais e biológicas compartilhadas entre DENV e ZIKV (CHANG et al., 2017) e a importância epidemiológica da infecção por esses vírus na saúde pública, nós avaliamos a atividade dos compostos, 1, UMN-1001 e UMN-1002 contra ZIKV, sendo esses dados parte do estudo que compõe essa tese (**Anexo II**) (MATOS DE SOUZA et al., 2020).

A maioria dos medicamentos em uso atualmente na clínica contra infecções virais é composta por antivirais de ação direta, ou seja, são fármacos que possuem mecanismo de ação direcionado contra proteínas virais como as proteases e polimerases (DE CLERCQ; LI, 2016b). Essa abordagem, embora de sucesso indiscutível, dificilmente desenvolve fármacos com amplo espectro dada a grande variabilidade entre as proteínas virais, que desempenham a mesma função, em vírus pertencentes a diferentes famílias, além de oferecerem uma baixa barreira para o desenvolvimento e seleção para mutações que conferem resistência às drogas (IRWIN et al., 2016).

A abordagem menos explorada e que surge como uma alternativa aos antivirais de ação direta, é o desenvolvimento de fármacos que modulam proteínas do hospedeiro que são compartilhadas por diferentes famílias virais o que permite o desenvolvimento de novas terapias preventivas, sendo de grande vantagem para o controle de possíveis novos surtos epidêmicos. Utilizar como alvo do tratamento vias de sinalização e proteínas do hospedeiro que são utilizadas pelos vírus para o sucesso de seus ciclos replicativos pode ainda oferecer uma maior barreira para a seleção de mutações de resistência, além do potencial amplo espectro do tratamento (LOU; SUN; RAO, 2014).

Todos os vírus conhecidos até o momento são dependentes da maquinaria de síntese proteica do hospedeiro, dessa forma, a modulação dessa via é um alvo terapêutico de grande potencial a ser melhor investigado (WALSH; MOHR, 2011).

A iniciação da tradução dos RNAs mensageiros (RNAm) de eucariotos ocorre através de duas principais vias: dependente de cap (via canônica da iniciação da tradução) e via direcionada por sítio interno de entrada de ribossomo (IRES). Como exemplo de vírus de relevância em saúde pública que utilizam a via IRES para síntese de suas proteínas temos o HCV e o poliovírus. (OCHS et al., 2002; OTTO; PUGLISI, 2004). A via IRES é independente de eIF4E e do reconhecimento da estrutura cap na extremidade 5' do RNAm, porém como os vírus discutidos nesse trabalho possuem como genoma uma molécula de RNA capeada na extremidade 5', iremos explorar a via canônica da iniciação da tradução.

A via de iniciação da tradução dependente de cap envolve o reconhecimento da estrutura cap metilada, Me⁷-GTP, localizada na extremidade 5' do RNAm eucariótico. O reconhecimento dessa estrutura é feito por eIF4E, que junto com os fatores eIF4G e eIF4A formam um complexo heterotrimérico denominado eIF4F, necessário para o início da tradução (HINNEBUSCH, 2009). O fator eIF4A possui atividade de helicase de RNA, eIF4G é uma proteína *scaffold* e eIF4E é a proteína responsável pela ligação e reconhecimento do cap (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Esse complexo multiproteico interage com cap via eIF4E, enquanto eIF4G estabiliza a interação com o RNAm e a helicase de RNA eIF4A, por sua vez, desenrola a estrutura secundária do RNA permitindo o acesso do complexo de pré-iniciação 43S que vai explorar a molécula de RNA até encontrar o códon de iniciação AUG no contexto ideal para a iniciação da tradução (HINNEBUSCH, 2011; SHIVAYA VALASEK, 2012).

A atividade do eIF4E na tradução é controlado pela via PI3K/Akt/mTOR (GINGRAS; RAUGHT; SONENBERG, 1999; MAMANE et al., 2006), e acredita-se que eIF4E seja o fator limitante para a formação do complexo trimérico eIF4F (DUNCAN; HERSHEY, 1983). A atividade de eIF4E é controlada por diferentes proteínas que se ligam a esse fator, chamadas

proteínas ligantes de eIF4E (4E-BP, do inglês, *eIF4E binding proteins*). A interação entre 4E-BP e eIF4E é regulada pela via PI3K/Akt/mTOR que induz fosforilação de 4E-BP, bloqueando a sua interação com eIF4E, deixando-o livre para interagir com eIF4G e estimular a montagem do complexo eIF4F com consequente indução da via de tradução dependente de cap (SILVERA; FORMENTI; SCHNEIDER, 2010; THUMMA; KRATZKE, 2007).

As pesquisas sobre os mecanismos moleculares envolvidos no controle da tradução em células tumorais como alvo para a terapia anticâncer levaram ao desenvolvimento de moléculas inibidoras da tradução (LI et al., 2013; MOERKE et al., 2007). Um desses compostos, o 4EGI-1, inibe a iniciação da tradução dependente de cap via dissociação da interação entre eIF4G e eIF4E e estabiliza a ligação entre 4E-BP hipofosforilada ao eIF4E, deixando-o indisponível para formação do complexo eIF4F (SEKIYAMA et al., 2015). Foi demonstrado anteriormente que 4EGI-1 possui atividade inibitória sobre a replicação do vírus herpes e do vírus da vaccínia, ambos vírus de DNA (MCMAHON; ZABOROWSKA; WALSH, 2011).

Recentemente, Wagner e colaboradores sintetizaram um composto pró-nucleotídeo, 4Ei-10, para a entrega intracelular de 7-Cl-Fenol-Etil-GMP, um antagonista seletivo de eIF4E análogo ao cap capaz de se ligar ao eIF4E, impedindo que este se ligue ao cap do RNAm celular (OKON et al., 2017b). A atividade biológica e o mecanismo de ativação química de 4Ei-10 foram previamente demonstrados *in vitro* em estudos com diferentes tipos de câncer, entretanto sua atividade antiviral nunca foi testada (AHMAD et al., 2020; JACOBSON et al., 2021; OKON et al., 2017b). Nesta tese, nos propusemos a investigar a potencial atividade antiviral de compostos pró-nucleotídeos inibidores da via canônica, dependente de cap, da iniciação da tradução, contra ZIKV e SARS-CoV-2.

A molécula do 4Ei-10, foi quimicamente modificada acrescentando um radical metiltioalquil com cadeia carbônica maior que a do 4Ei-10, com o intuito de aumentar o tempo de meia-vida e a lipofilicidade da molécula. O novo ProTide, chamado 4Ei-11, ainda não teve sua atividade antitumoral testada, entretanto como ambos são AHA-ProTides que compartilham como

farmacóforo um antagonista de eIF4E análogo de cap, por tanto, inibem a iniciação da via canônica da tradução, a atividade de ambos ProTides contra ZIKV e SARS-CoV-2 foi avaliada nesse trabalho. A **figura 5** mostra a estrutura dos ProTides 4Ei-10 e 4Ei-11 e o seu mecanismo de ativação.

Tanto ZIKV quanto SARS-CoV-2 possuem como genoma uma molécula de fita simples de RNA de polaridade positiva capeada na extremidade 5', sendo por tanto molde para a iniciação da tradução pela via canônica dependente de cap. Entende-se, e há evidências científicas que esses vírus utilizem essa estratégia para a síntese das suas proteínas (BANERJEE et al., 2020; SANFORD et al., 2019; SONG et al., 2019a).

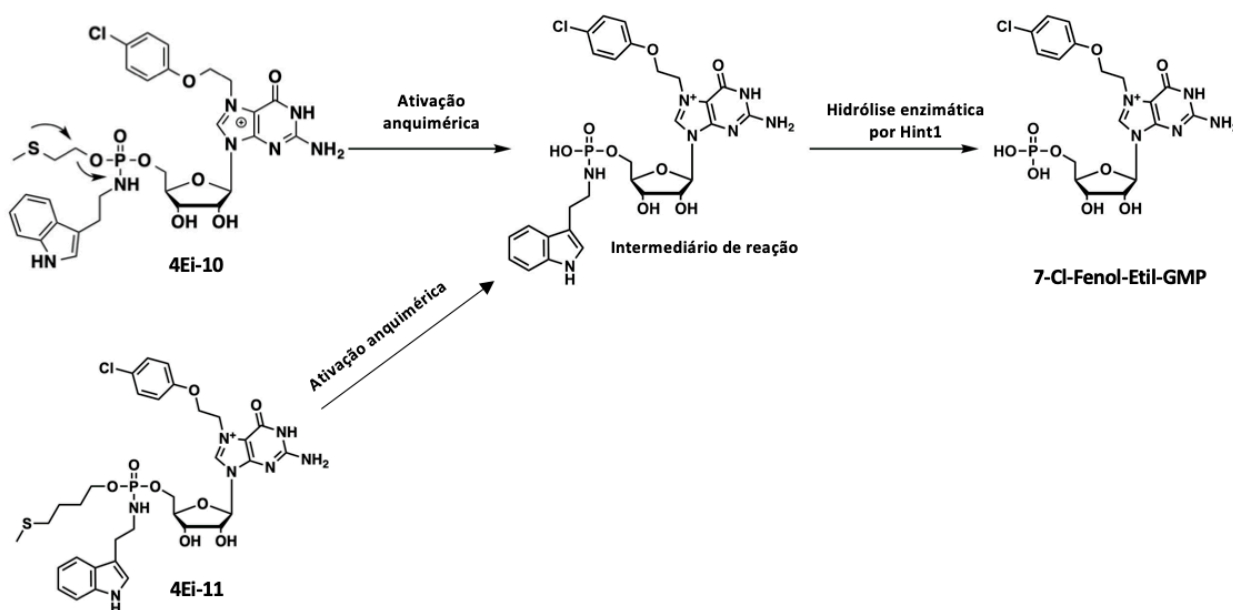


Figura 5 Estrutura química e mecanismo de ativação intracelular dos AHA-ProTides 4Ei-10 e 4Ei-11. Após atravessarem a membrana plasmática, 4Ei-10 e 4Ei-11 passam inicialmente por uma etapa química mediada pela porção (metiltio)alquil, que sofre uma reação nucleofílica mediada pelo átomo de enxofre, denominada assistência anquimérica, gerando o intermediário de reação que é, em seguida, hidrolisado pela fosforamidase Hint1 na ligação entre os átomos de nitrogênio e fósforo do grupamento triptamina, liberando o análogo de cap, 7-Cloro-fenol-etil-GMP. Adaptado de Ahmad *et al.*, 2020.

1.2 O redirecionamento de fármacos

Em média, o desenvolvimento de um novo medicamento desde a descoberta do seu alvo até a sua aprovação para uso comercial leva 12 anos e requer investimento de cerca de 1 bilhão de dólares americanos (DEORE et al., 2019; DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016). O tempo e

o custo investidos no desenvolvimento de um novo fármaco estão associados ao fato desse processo ser complexo e feito em diferentes etapas que têm como objetivo principal garantir a segurança, eficácia e a efetividade do seu uso na população.

O desenvolvimento de um novo fármaco passa, obrigatoriamente, pelas seguintes etapas: fase experimental ou pré-clínica, onde a hipótese de uso potencial da molécula investigada é avaliada utilizando modelos celulares e animais, principalmente roedores; as etapas clínicas envolvendo seres humanos, dividida em 4 etapas. Nas fases de I a III utiliza-se uma quantidade gradualmente crescente de indivíduos e elas caracterizam os estudos de farmacocinética e farmacodinâmica visando garantir a segurança, eficácia, definição da dose eficaz e análise de risco/benefício. O tempo médio das fases clínicas de I a III gira em torno de 7 anos. A fase clínica IV, última etapa da fase clínica, é a etapa de estudo de farmacovigilância e promove a experiência com o produto já registrado e disponível no mercado. Nessa etapa também é avaliado novas indicações para o medicamento (BERDIGALIYEV; ALIJOFAN, 2020).

Diante desse cenário, o redirecionamento de fármacos surge como uma alternativa consideravelmente de menor custo, mais rápida e igualmente segura. Em linhas gerais, o reposicionamento de fármacos consiste com redirecionar um medicamento aprovado inicialmente para uma condição clínica, para o tratamento de uma nova patologia não relacionada àquela. Como exemplos de sucessos obtidos por essa estratégia temos o ácido acetilsalicílico, originalmente aprovado como analgésico e redirecionado para uso como antiagregante plaquetário (FISCHL et al., 1987), a zidovudina, desenvolvida para a terapia anticâncer e redirecionada para o tratamento da infecção pelo HIV (GURBEL et al., 2019) e, mais recentemente, o Remdesivir, desenvolvido para o tratamento da infecção pelo vírus ebola, aprovado para o tratamento da COVID-19 (RUBIN et al., 2020)

Nos últimos anos, pesquisas que visam redirecionar fármacos antirretrovirais para o tratamento de outras infecções virais têm crescido (MERCORELLI; PALÙ; LOREGIAN, 2018). Os antirretrovirais Lopinavir, Darunavir, ambos inibidores da protease do HIV e Tenofovir, inibidor

da transcriptase reversa do HIV, tiveram seu uso investigado no tratamento da COVID-19 e, embora apresentem bons resultados *in vitro*, não foram encontradas evidências suficientes que garantissem a eficácia de seu uso na clínica contra COVID-19 (CHOY et al., 2020; HORBY et al., 2020).

O Efavirenz (EFV) é um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa do HIV-1 com uso na clínica há mais de duas décadas na terapia combinada antirretroviral. Sua atividade antiviral é devido à formação de uma bolsa hidrofóbica próximo ao sítio ativo da transcriptase reversa, alterando a conformação do sítio de ligação do substrato natural, com consequente redução da atividade de polimerase dessa enzima (BASTOS et al., 2016; DESTEFANO, 2019).

Para além do uso na infecção viral, o EFV, vem sendo estudado para o tratamento do Mal de Alzheimer, câncer pancreático e de pulmão e leishmaniose. Seu possível papel no tratamento do Mal Alzheimer é devido sua capacidade de ativação da CYP46A1, que regula o metabolismo do colesterol no cérebro (PETROV et al., 2019). A indução da via de resposta ao dano de DNA e de estresse oxidativo pelo EFV colocam esse fármaco como possível agente terapêutico para o tratamento de câncer de pulmão e de pâncreas (HECHT et al., 2017; MARIMA et al., 2020). Portanto, nota-se que o EFV é uma droga multifacetada e a exploração de seus diferentes mecanismos de ação em diferentes alvos, permite a investigação de seu uso em condições clínicas não relacionadas.

Dados recentes do nosso grupo mostram que o EFV tem atividade contra o vírus Chikungunya (CHIKV) em cultura de células humanas e foi capaz de reduzir inflamação em modelo *in vivo* de infecção aguda (Dados não publicados. Artigo em preparação) (**Figura 6**). Acreditamos que a atividade antiviral do EFV contra CHIKV ocorre pela indução da via de indução de autofagia e estresse oxidativo, atuando, por tanto, como um antiviral de ação indireta. Embora seja uma via catabólica, alguns vírus possuem estratégias para o sequestro de componentes da via de autofagia e uso em benefício do sucesso de seu ciclo replicativo (ECHAVARRIA-CONSUEGRA; SMIT; REGGIORI, 2019). Pesquisas apontam para um papel pró-viral desempenhado pela autofagia na replicação do CHIKV. Por exemplo, foi demonstrado que um

receptor de autofagia, NDP52, interage com a proteína não estrutural nsP2 do CHIKV em células HeLa e fibroblastos primários humanos, e essa interação ocorre na região perinuclear próximo dos sítios de tradução proteica, indicando que a autofagia pode promover replicado do CHIKV em células humanas, além disso a depleção desse receptor reduziu significativamente a replicação do CHIKV (JUDITH et al., 2013).

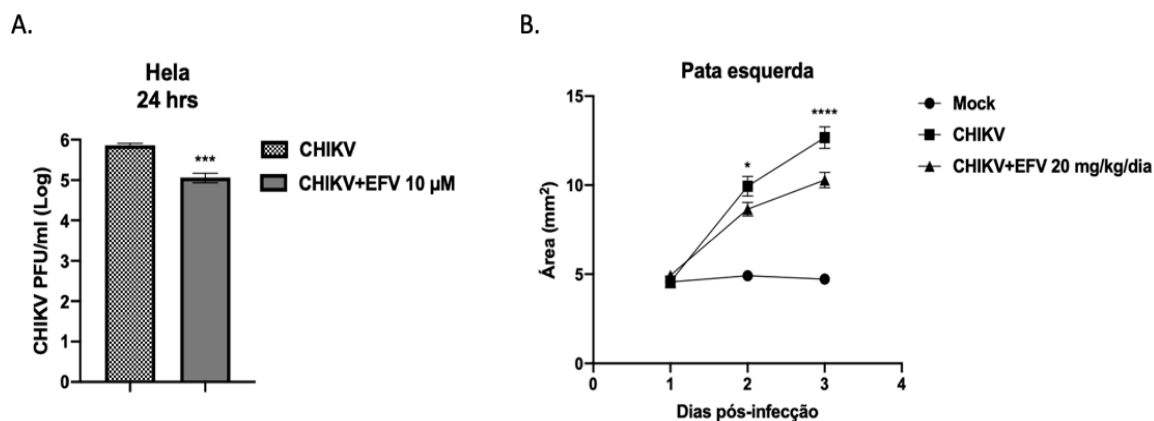


Figura 6 Atividade antiviral do Efavirenz contra o vírus Chikungunya (A). Células epiteliais de adenocarcinoma humano (HeLa) foram infectadas com CHIKV (MOI 0,1) e tratadas com Efavirenz (EFV) a 10 µM por 24 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para quantificação das partículas virais infecciosas liberadas por ensaio de formação de placa. (B). Camundongos selvagens SV129 com 12 dias de vida foram infectados com um isolado brasileiro do CHIKV (10^6 PFU), ou meio de cultura com 1% DMSO (grupo Mock) via subcutânea na pata esquerda. Os animais do grupo tratado receberam EFV 20 mg/kg/dia por 3 dias via intraperitoneal. As patas dos animais foram medidas diariamente para calcular a área e verificação de edema. *** $p < 0,001$ por teste *t* paramétrico não pareado; * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ por one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett para comparações múltiplas. As barras representam a média±D.P.M. N=3.

Já foi demonstrado que o EFV induz autofagia, dano mitocondrial e induz forte resposta de estresse oxidativo (DONG et al., 2013; PURNELL; FOX, 2014). Durante a infecção, o CHIKV induz autofagia por indução de estresse de retículo e aumento das espécies reativas de oxigênio (JOUBERT et al., 2012). Uma possível explicação para a atividade do EFV contra CHIKV é que, embora CHIKV induza autofagia para utilizar componentes da via para sua replicação na célula, a indução do fluxo autofágico pelo EFV é mais intensa que a capacidade do CHIKV de controlá-la a seu favor.

A atividade do EFV sobre uma via do hospedeiro explorada por diferentes vírus não relacionados, como a autofagia e resposta a estresse oxidativo nos leva a crer que seu uso possa ser estendido a diferentes vírus. Baseado nos resultados com CHIKV, e sabendo que a infecção por

SARS-CoV-2 está relacionada à indução de autofagia e estresse oxidativo, decidimos investigar se o EFV possui atividade contra a infecção por SARS-CoV-2.

1.3 Os Flavivirus: Estrutura, organização genômica e estratégia de replicação

Os *Flavivirus* apresentam-se como pequenas partículas virais esféricas contendo uma única cópia de RNA de fita simples, polaridade positiva, circundada pela proteína viral do capsídeo (proteína C) formando o nucleocapsídeo. Este é envolto por uma bicamada fosfolipídica, derivada do retículo endoplasmático (RE), que forma o envelope viral onde estão inseridas duas glicoproteínas: proteína E e proteína pré-M/M (**Figura 7**) (ZHANG, 2003). Os principais flavivirus de importância médica para o homem são o vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus da dengue (DENV), o vírus Zika (ZIKV) e o vírus do Nilo ocidental (WNV). O foco dessa descrição, porém, serão os vírus da dengue e Zika pois são os objetos de estudo desta tese.

O genoma dos flavivirus, incluindo o DENV e ZIKV, possui aproximadamente 11.000 bases e é reconhecido como RNA mensageiro (RNAm) viral na célula infectada. O RNA desses vírus possui uma estrutura cap (m⁷GpppAmp) na extremidade 5', entretanto diferente das moléculas de RNAm da célula hospedeira, o genoma viral não é poliadenilado na extremidade 3' (**Figura 8**) (LEE et al., 2021).

Esse genoma possui uma única janela aberta de leitura, ou ORF (do inglês, *open Reading frame*), é flanqueado nas extremidades 5' e 3' por regiões não traduzidas, denominadas UTR (do inglês, *untranslated regions*) de aproximadamente 100 nucleotídeos e de 400 a 700 nucleotídeos, respectivamente (GRITSUN et al., 2014). A partir da região 3'UTR do genoma dos *Flavivirus*, é produzida ainda uma molécula de RNA não codificante, denominada RNA subgenômico dos flavivirus (sfRNA) (CLARKE et al., 2015). O sfRNA é produzido após a degradação incompleta do genoma viral pela 5'-3'-exoribonuclease celular (NXR1), que é impedida de degradar completamente o RNA viral pela presença de estruturas secundárias na região 3'UTR, e está

envolvida em mecanismos de modulação de vias celulares de RNA de interferência, bem como com a resposta antiviral mediada por IFN (CLARKE et al., 2015; MANOKARAN et al., 2015).

A interação de DENV e ZIKV com suas células-alvo se dá através de receptores que reconhecem padrões moleculares dos patógenos, para sua adsorção e entrada, por exemplo, o receptor DC-SIGN para o DENV e o receptor Axl para o ZIKV (STRANGE et al., 2019; TASSANEETRITHEP et al., 2003). Já foi demonstrado que esses flavivírus também podem penetrar nas células que expressam receptores para a fração Fc de imunoglobulina G (FcγR) por complexos imunes formados entre anticorpos parcialmente neutralizantes e partículas virais (BARDINA et al., 2017; GUZMAN et al., 2010).

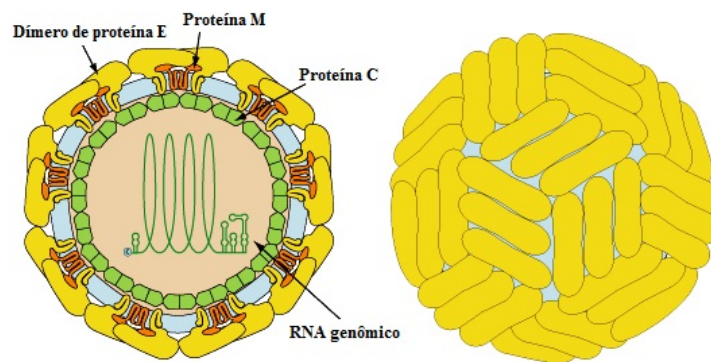


Figura 7 A partícula viral dos Flavivírus. A figura à esquerda mostra o vírion em plano coronal, onde se observa o material genético constituído de uma fita simples de RNA, que junto com a proteína C formam o nucleocapsídeo viral. Ao redor do nucleocapsídeo está representada a bicamada lipídica que forma o envelope viral onde estão inseridas as proteínas E em dímeros e a proteína M. À direita está representada a partícula viral esférica com as proteínas de superfície em arranjo icosaédrico. Adaptado de Viral Zone, Instituto Suíço de Bioinformática. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/6756.html.

Após penetrar na célula, o vírus é carregado pela vesícula endossomal, onde a acidificação do seu interior é responsável por induzir mudanças conformacionais na glicoproteína E do envelope viral, promovendo a fusão entre as membranas do vírus e do endossoma da célula hospedeira e leva ao desempacotamento viral com liberação do capsídeo no citoplasma da célula, onde esse se dissocia liberando o RNA genômico viral (BRESSANELLI et al., 2004; MODIS et al., 2004).

Uma vez liberado no citoplasma, o RNA viral é traduzido gerando uma única poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos que é direcionada à face externa do RE onde passa por processamento proteolítico, durante e após o processo de tradução, tanto por enzimas celulares do

hospedeiro quanto pela protease codificada pelo próprio vírus NS2B/NS3, para então gerar as três proteínas estruturais (proteína C do capsídeo, Pré-Membrana/Membrana e proteína E do Envelope) e as sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas estruturais constituem a partícula viral, enquanto as proteínas não estruturais estão relacionadas à replicação viral, processamento da poliproteína, montagem do vírus e evasão das respostas antivirais do hospedeiro (PAUL; BARTENSCHLAGER, 2015; VALADÃO; AGUIAR; DE ARRUDA, 2016).

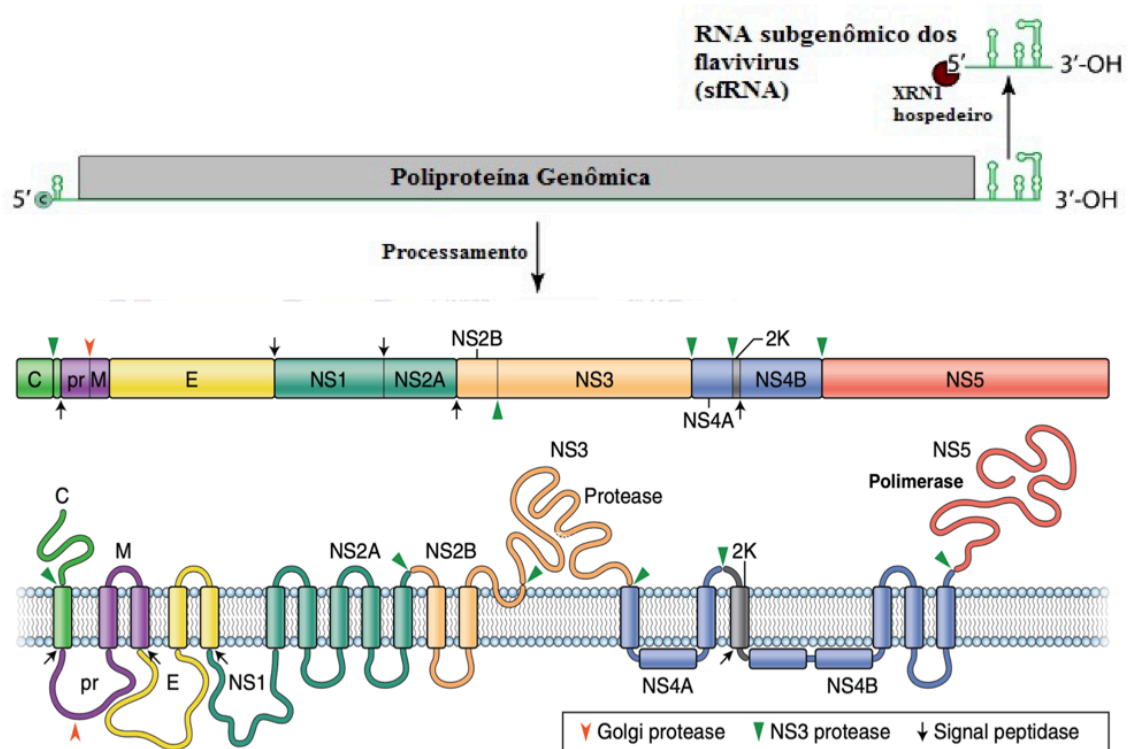


Figura 8 Representação linear do genoma e da poliproteína dos Flavivírus. O genoma viral é constituído de uma simples fita de RNA, polaridade positiva, com aproximadamente 11 Kb, capeado na região 5'UTR e não poliadenilado na região 3'UTR. O RNA viral é infeccioso e atua como genoma e RNAm viral. O genoma completo é traduzido em uma única poliproteína viral com 3.419 AA de extensão e uma molécula de RNA subgenômico (sRNA) formada pela ação da 5'-3' exoribonuclease celular (XRN1). A poliproteína viral é processada por enzimas celulares do hospedeiro e protease viral NS2B/NS3 (representado pelas setas), dando origem às proteínas estruturais: C, pré-M/M e E; e não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Adaptado de ViralZone, Instituto Suíço de Bioinformática, 2016 e Pierson, T.C; Diamon, M.S, 2020.

De forma geral, a replicação dos *Flavivírus* acontece em membranas associadas ao RE. A formação dessas membranas é induzida pelas proteínas não estruturais do vírus e a replicação do material genético é catalisada pela NS5 viral, que tem função RNA polimerase dependente de RNA

(RpRd), utilizando uma fita simples de polaridade negativa de RNA como intermediário da replicação (LI et al., 2008; YU et al., 2008). A formação da fita negativa complementar do genoma viral, pode acontecer a partir do acoplamento da NS5 no terminal 3' ou 5' do genoma (FILOMATORI, 2006; WESTAWAY; MACKENZIE; KHROMYKH, 2003), em ambas as possibilidades, ocorre a circularização do genoma viral através de interações entre as duas extremidades do RNAm para iniciar a síntese da fita intermediária negativa de RNA. Durante a replicação, a fita negativa de RNA permanece ligada à positiva formando uma dupla fita de RNA que serve como molde para a síntese de mais moléculas de RNA genômico de polaridade positiva através de um mecanismo semiconservativo assimétrico (FILOMATORI, 2006).

As membranas formadas nas células do hospedeiro para a replicação viral funcionam como um suporte para a ancoragem dos complexos de replicação viral constituídos de RNA e proteínas virais e fatores celulares do hospedeiro (MACKENZIE, 2005). O processo de montagem é um evento coordenado entre as proteínas do capsídeo associadas à membrana e os heterodímeros das proteínas virais pré-M e E (KIERMAYR et al., 2004).

As partículas virais não infecciosas recém-formadas brotam do RE, e nelas o RNA viral já se encontra conjugado à proteína do capsídeo e estão envolvidas por uma bicamada lipídica derivada do RE contendo as proteínas pré-M e E em heterodímeros (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001). A maturação do vírion ocorre durante a passagem da partícula através do Complexo de Golgi onde sofre reações de glicosilação e modificações conformacionais nos seus heterodímeros de pré-M e E mediadas pela redução do pH desse compartimento (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001). Essas modificações conformacionais expõem no peptídeo pré-M o sítio de clivagem que será reconhecido pela enzima do hospedeiro furina, ocasionando a liberação de pré-M, gerando a forma madura da proteína M, seguida da exocitose da partícula viral madura através da membrana celular (**Figura 9**) (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001; SIROHI; KUHN, 2017).

Apesar das semelhanças estruturais da partícula viral, da composição do genoma, estratégia de replicação e de serem transmitidos ao homem através do mesmo vetor, a patogênese

da infecção por esses vírus possui características distintas decorrente principalmente de aspectos específicos da interação vírus-célula desses vírus. Desta forma, o entendimento das relações vírus-hospedeiro é imprescindível para que possamos desenvolver estratégias específicas de controle para DENV e ZIKV.

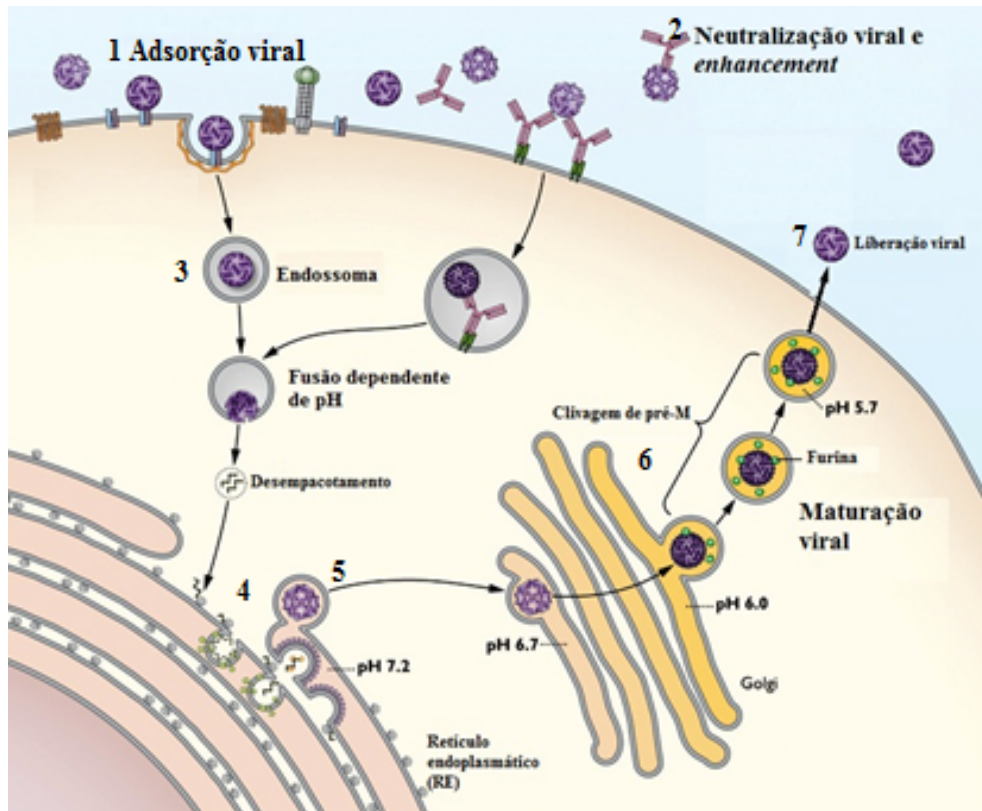


Figura 9 Representação esquemática do ciclo replicativo dos Flavivírus. 1. A interação entre DENV e ZIKV e a célula hospedeira se dá através de interação entre a proteína E do vírion e diversas moléculas que atuam como receptores na superfície da célula alvo. 2. A entrada do vírus na célula também pode ocorrer através dos complexos imunes formados entre os anticorpos neutralizantes e partículas virais. 3. Após a interação entre o vírion e o receptor na superfície da célula, a partícula viral é endocitada e transportada no compartimento endossomal para o retículo endoplasmático (RE). Nesse compartimento, a redução do pH desencadeia alterações conformacionais na partícula viral e promove fusão do envelope viral e a membrana endossomal, levando ao desempacotamento do nucleocapsídeo viral com liberação do RNA genômico no citoplasma, onde ocorre a tradução das proteínas virais. 4. A replicação viral acontece predominantemente em membranas associadas ao RE induzidas por proteínas virais não estruturais. 5. Os vírions brotam do RE ainda imaturos e são direcionados para o complexo de Golgi, onde passam por reações de glicosilação e alteração conformacional à medida que o meio sofre acidificação. 6. A maturação viral continua acontecendo durante sua liberação do Golgi. Nessa etapa, as mudanças conformacionais expõem o sítio de clivagem em pré-M para a enzima celular furina que atua clivando esse pré-peptídeo, dando origem à proteína M. 7. A partícula viral, agora madura, sai da célula hospedeira por processo de exocitose. Adaptado de NIAID 2012.

1.4 O vírus da dengue

O vírus da dengue é um arbovírus (do inglês *Arthropod-borne virus*) adaptado ao homem, não necessitando de um ciclo enzoótico para sua manutenção (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). Embora haja relatos de surtos de doença consistente clinicamente com a dengue ao longo dos séculos, o vírus só foi isolado pela primeira vez em 1943 no Japão (MESSINA et al., 2014).

Existem quatro diferentes sorotipos antigenicamente relacionados e denominados DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 (ROSS, 2010). Todos os quatro sorotipos estão associados com epidemias de dengue com graus variados de gravidade da doença (WHO, 2011). Cada sorotipo está classificado em genótipos, ou subtipos, filogeneticamente distintos, de acordo com a sequência gênica da glicoproteína E do envelope viral (GUZMAN et al., 2010), e a infecção com qualquer um dos sorotipos confere imunidade permanente sorotipo-específica.

A transmissão do vírus ocorre através picada da fêmea de mosquitos *Aedes sp.* principalmente aa espécies *Aedes aegypti e albopictus* (MESSINA et al., 2014), mas *A. polyeniensis* também são vetores competentes da dengue (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Após o repasto sanguíneo em um indivíduo apresentando viremia, o mosquito se torna infectado e, após um período de incubação no vetor vertebrado, onde o vírus vai replicar e se disseminar, o mosquito poderá transmitir o vírus para outro ser humano (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004).

A dengue é endêmica em mais de 100 países localizados em cinco das seis regiões do globo segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS): África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental (WHO, 2009). A cada ano, ocorrem aproximadamente 50 milhões de infecções e 500.000 hospitalizações com complicações causadas pela dengue, na maioria das vezes com fenômenos hemorrágicos e 20.000 mortes principalmente de crianças (GUZMAN et al., 2010). Segundo dados do Ministério da Saúde, desde fevereiro de 2020, início da pandemia por COVID-19 no Brasil, os registros de casos prováveis e óbitos por dengue estão diminuindo em todo o país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Essa diminuição pode ser

consequência de subnotificações ou atrasos nas notificações causados pela mobilização das equipes de saúde para o enfrentamento da pandemia da COVID-19. Dados da Organização Pan-americana de Saúde, mostram que no ano de 2020 foram registrados mais de 2 milhões de casos de dengue nas américas (PAHO, 2020).

1.4.1 A infecção pelo vírus da dengue

Em humanos, o DENV passa por um período de incubação intrínseca que pode durar de 4 a 7 dias. A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou causar um quadro de doença febril moderado e autolimitante, geralmente acompanhado de exantemas e, por fim, evoluir para um conjunto de alterações fisiológicas sistêmicas, como ativação exacerbada do sistema complemento, complicações vasculares, alterações hematopoiéticas, trombocitopenia e comprometimento hepático (GUZMAN; HARRIS, 2015).

Do ponto de vista clínico, a dengue pode ser dividida em três fases: febril, crítica e de recuperação. A fase febril é acompanhada por mialgia, artralgia, dor retro orbital e exantema máculo-papular. A maioria dos pacientes evolui para a fase de recuperação em cerca de 8 dias, entretanto alguns evoluem para a fase crítica que pode ter ou não os sinais de alarmes (e.g. vômito persistente, sangramento de mucosa, dor abdominal intensa). A forma grave da dengue se manifesta com extravasamento de líquidos, choque, hemorragias graves e falência múltipla dos órgãos, podendo ser fatal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Além de reposta imune inata, a infecção por DENV também leva à ativação de resposta humoral. A resposta humoral induzida por DENV pode exercer proteção ao indivíduo, mas também pode atuar como um catalisador da evolução clínica para a forma mais grave da doença. Durante a infecção primária, os anticorpos neutralizantes que reconhecem epitopos específicos da proteína viral E são os responsáveis pela imunidade sorotipo-específica mais potente (DE ALWIS et al., 2012). Enquanto a infecção primária confere proteção duradoura contra a reinfecção por um sorotipo homólogo ou proteção por até 6 meses contra a infecção por um sorotipo heterólogo, a

segunda infecção quando ocorre por um sorotipo diferente da primeira traz um risco maior de evolução para a forma grave da dengue (RICO-HESSE, 2003).

Apesar dos diversos estudos sobre a patogênese da dengue, ainda não se tem o completo conhecimento a cerca de todos os fatores que podem levar à forma grave da doença, porém, sabe-se que a progressão da doença é dependente das características imunológicas e genéticas do indivíduo, bem como da existência de doenças de base e virulência da cepa viral (GUZMAN et al., 2016; SUWANMANEE; LUPLERTLOP, 2017).

1.5 O vírus Zika

O vírus Zika foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika em Uganda, a partir de amostra de macacos *rhesus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Desde então, poucos relatos da infecção por ZIKV ocorreram, ficando restrito ao continente Africano e ao sudeste da Ásia (WIKAN; SMITH, 2016).

Cerca de seis décadas após ser isolado pela primeira vez, o ZIKV causou a primeira grande epidemia fora da Ásia e África em 2007, quando foram confirmados 108 casos de infecção pelo ZIKV e nenhuma morte, nas Ilhas Yap, pertencente à Micronésia (DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008). Em 2013, o ZIKV causou um surto na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU et al., 2014) e em maio de 2015, o primeiro caso autóctone de infecção pelo vírus Zika foi registrado no Brasil. A partir desse ano, o vírus se alastrou pela América do Sul e Caribe até chegar aos Estados Unidos em 2016 (POSSAS, 2016). A partir das Américas, o vírus alcançou distribuição mundial devido a fatores como a ampla distribuição e adaptação do mosquito vetor e as viagens e o comércio intercontinentais associados à população susceptível à infecção (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

A principal forma de transmissão do ZIKV é através da picada da fêmea de mosquitos *Aedes sp.* principalmente aa espécies *Aedes aegypti e albopictus*, contudo, diferente da maioria dos flavivírus, o ZIKV pode ser transmitido de humano para humano, mesmo que de maneira

minoritária, de maneira independente do vetor invertebrado, pela via materno-fetal e sexual (BARJAS-CASTRO et al., 2016; FOY et al., 2011; HOLTZMAN; GOLDEN; SHEFFIELD, 2018). Essa capacidade pode ser reflexo da relativa estabilidade do vírus em diferentes fluidos corporais, muito embora ainda seja preciso estabelecer como essa acentuada estabilidade está relacionada a esse tipo de transmissão (PIERSON; DIAMOND, 2020).

O ZIKV é classificado em duas linhagens: Africana e Asiática/Americana. As epidemias recentes associadas a grave comprometimento neurológico e anomalias congênitas foram causadas pelo espalhamento da linhagem Asiática/Americana do ZIKV vindo do sudeste da Ásia (LANCIOTTI et al., 2008, 2016). A partir de análises filogenéticas feitas com o genoma completo do ZIKV indicam que linhagem Asiática/Americana pode ser ainda dividida em três subtipos: Americano, Pacífico e do Sudeste Asiático (HASHIMOTO et al., 2017; PETTERSSON et al., 2016).

A associação entre a infecção pelo ZIKV e a microcefalia começou a ser delimitada a partir de evidências de manifestações clínicas da doença causada pelo vírus e dos achados laboratoriais tanto nas gestantes quanto nos recém-nascido ou detecção do vírus em natimortos (WU et al., 2016). Entretanto, com estudos avançados de tomografia computadorizada e ressonância magnética foi possível observar, não só a microcefalia, mas atrofia cerebral, calcificação intra cranial, assimetria dos hemisférios cerebrais além de más-formações do desenvolvimento cortical e alterações laboratoriais mostrando que se tratava de uma síndrome congênita causada pelo ZIKV (WANG; LING, 2016).

Semelhante aos dados epidemiológicos observados para dengue, no Brasil, desde o início da pandemia de COVID-19, observa-se grande redução dos registros de casos de infecção por ZIKV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Os dados epidemiológicos do final de 2019, anterior ao início da pandemia de COVID-19, mostram que foram relatados casos de transmissão autóctone de ZIKV em 87 países, apesar da incidência da infecção por ZIKV ter caído substancialmente desde seu pico

em 2016. (OMS, 2019). Apesar da redução dos números, o ZIKV é um vírus potencialmente reemergente e para o qual não dispomos de medicamentos ou vacinas licenciados.

1.5.1 A infecção pelo vírus Zika

O ZIKV tem um período de incubação extrínseca que dura de 4 a 5 dias no hospedeiro humano. A infecção pelo ZIKV pode ser assintomática ou resultar em uma sintomatologia moderada com doença febril, dor retro orbital, conjuntivite, *rash* cutâneo maculopapular pruriginoso, artralgia e dor nas articulações (ABUSHOUK; NEGIDA; AHMED, 2016). A infecção pelo ZIKV também pode estar associada à incidência de Síndrome de Guillain-Barré (SGB), provavelmente por indução ou mimetismo de reação autoimune provocada pelo vírus (ARAUJO; FERREIRA; NASCIMENTO, 2016).

Entretanto, os quadros mais graves estão associados à transmissão do ZIKV via transplacentária, durante a gestação, podendo causar abortos, natimortos e a síndrome congênita do vírus Zika com consequências que abrangem microcefalia e demais alterações neurológicas como lisencefalia, alterações no corpo caloso e calcificações intracelulares, porém os mecanismos não estão elucidados (BRASIL et al., 2016; WANG; LING, 2016). Complicações neurológicas em adultos também estão associadas à infecção pelo ZIKV como encefalomielite (ROTH et al., 2017).

O ZIKV infecta primeiramente as células susceptíveis e permissivas localizadas próximas ao local da inoculação do vírus no hospedeiro mamífero, como os fibroblastos da derme e as células dendríticas da epiderme, seguido de replicação nos linfonodos regionais e, então se dissemina pela corrente sanguínea até alcançar órgãos e tecidos pelos quais tenha tropismo (HAMEL et al., 2015b; PIERSON; DIAMOND, 2020).

Entretanto, resultados recentes apontam que a má formação dos tecidos cerebrais e comprometimento do desenvolvimento neuronal podem ser resultado direto da infecção de células progenitoras neuronais onde o vírus induz diminuição da neurogênese e inflamação persistente (GARCEZ et al., 2017; LIMA et al., 2019).

1.6. O controle da infecção pelo vírus da dengue e vírus Zika

O tratamento para infecções pelo vírus da dengue e/ou vírus Zika é baseado na terapia de suporte à sintomatologia do paciente e não específico contra os vírus, pois ainda não temos, até o momento, fármacos licenciados, capazes de controlar a replicação viral para serem utilizados em humanos (PIERSON; DIAMOND, 2020). O manejo terapêutico do paciente com as formas mais graves da dengue, por exemplo, consiste no monitoramento do quadro clínico e parâmetros hematológicos e bioquímicos, hidratação para controle dos fluídos e tratamento paliativo com analgésicos e antitérmicos de acordo com os sintomas apresentados (OMS, 2011). Enquanto pra infecção sintomática do ZIKV, o tratamento é baseado no uso de medicamento para controle da febre (e.g acetaminofeno e dipirona) e anti-histamínicos para o caso de haver erupções pruriginosas (KLITZKE et al., 2016).

Esforços para controle e prevenção da infecção pelo DENV levaram ao desenvolvimento de uma vacina aprovada em 2015 (Dengvaxia[®]) para ser usada em pacientes de 9 a 45 anos. Trata-se de uma vacina tetravalente, com 4 formas recombinantes dos sorotipos do DENV (DENV1-4) e o vírus atenuado da vacina da febre amarela (17D204) (HUANG et al., 2013). Apesar dos esforços, a eficácia dessa vacina ainda está abaixo do nível considerado como satisfatório para os sorotipos 2 e 4 do DENV e também está associada com risco elevado de hospitalização em crianças abaixo de 9 anos (AGUIAR; HALSTEAD; STOLLENWERK, 2016).

Para o ZIKV, as estratégias para o desenvolvimento de uma vacina preventiva envolvem diversas abordagens moleculares como vírus vivo atenuado, vacina baseada em ácido nucleico, com vetores vivos e nanopartículas (WHO, 2016). Também aparece como estratégia de prevenção a pré-imunização com anticorpos neutralizantes isolados de pacientes com infecção por ZIKV, mostrando eficácia em reduzir a transmissão transplacentária em estudos feitos em camundongos (SAPPARAPU et al., 2016). Dentre essas abordagens, a única que recebeu aprovação para realizar estudos clínicos de fase I até o momento foi a utilização de vacina de DNA (LAROCCA et al., 2016; MORRISON, 2016).

Apesar de a vacinação ser uma medida interessante para o controle e prevenção da infecção por esses flavivírus, a possibilidade de reação cruzada e agravamento da infecção tanto por anticorpos anti-DENV quanto por anti-ZIKV é um fator limitante no desenvolvimento dessa estratégia (SINGH et al., 2017).

Além do desenvolvimento de vacinas e estratégias de prevenção da infecção por esses vírus, também é importante focar em estudos que busquem intervenção farmacológica que impeça etapas importantes do ciclo replicativo viral. Nesse sentido, diferentes abordagens têm sido empregadas para a identificação de um composto efetivo contra esses vírus, dentre elas, o uso de fármacos que impedem a entrada do vírus na célula se ligando ao sítio de ligação da proteína E do envelope viral (NEYTS et al., 2012), ou inibindo possíveis receptores da célula hospedeira (RICHARD et al., 2005; TABATA et al., 2016). Outra abordagem são os fármacos que têm como alvo as proteínas não estruturais como NS3, NS5 (MASTRANGELO *et al.*, 2012; BYRD *et al.*, 2013), e NS2B/NS3 (YIN *et al.*, 2006; STOERMER *et al.*, 2008; TOMLINSON; WATOWICH, 2012).

1.7 Coronavírus e o SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 pertence ao gênero dos Betacoronavirus, subfamília *Orthocoronavirinae*, da família *Coronaviridae*. Essa família é caracterizada por vírus envelopados que possuem como genoma um RNA simples fita de polaridade positiva (ssRNA+) não segmentado, assim como todos os vírus da ordem *Nidovirales*, e grandes espículas contornando a partícula viral. Seus genomas são os maiores dentre os vírus de RNA, com 26 a 32 kilobases, e possuem organização genômica semelhante entre si, além de compartilhar estratégias de expressão dos genomas (SU et al., 2016). Dentro dos *Orthocoronaviridae* existem dois principais gêneros de interesse humano: *Alphacoronaviridae* e *Betacoronaviridae*. Existem, ao todo, 7 coronavírus capazes de infectar humanos e causar doença (MALIK, 2020).

HCoV-229E e HCoV-NL63 são alphacoronavirus que infectam humanos e responsáveis por causar resfriados comuns. O primeiro, descoberto em 1966, foi isolado do trato respiratório de pacientes na busca por agentes causadores de resfriado comum (HAMRE; PROCKNOW, 1966), causa sintomas característicos de uma infecção viral moderada e está distribuído por todo o mundo, sendo comum o aumento de casos no inverno. Já o segundo, também com distribuição global e que causa sintomas de resfriado comum, foi isolado em 2004 e acomete principalmente crianças, idosos e imunossuprimidos (VAN DER HOEK et al., 2004; SU et al., 2016).

Os betacoronavírus que infectam humanos são: HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-Cov e, mais recentemente, o SARS-CoV-2. O primeiro foi isolado em 1967 e o segundo em 2005 (WOO et al., 2005). Ambos, assim como os alphacoronavirus, também causam doenças com sintomas de resfriado comum, indistinguíveis entre si. Tanto SARS-CoV quanto MERS-CoV se destacaram dos outros coronavírus de humanos por causarem infecções mais graves e terem gerado episódios pandêmicos.

O SARS-CoV é o agente etiológico da doença denominada SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*). O evento de *spillover*, ocorreu em 2002 em um mercado vivo na província chinesa de Guangdong, levando a um posterior surto em Hong Kong. Ao todo, 4 países foram afetados durante 9 meses pela pandemia causada por esse coronavírus. A infecção por SARS-CoV difere das infecções causados por outros coronavírus por apresentar sintomas mais graves e maior taxa de caso fatalidade. Durante toda a pandemia, foram registrados 8273 casos e 775 mortes, resultando em uma taxa de mortalidade de 9%. Os casos foram contidos com quarentena local, e casos isolados ocorreram posteriormente (RABAAN et al, 2020, SU et al, 2016).

O MERS-CoV é o agente etiológico da doença denominada MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*). Os sintomas também são mais graves, como falência renal e pneumonia, podendo levar à morte. O MERS-CoV foi isolado de um paciente na Arábia Saudita em 2012, e até 2014, foram estimados 855 casos e 333 mortes, resultando em uma taxa de 40% de mortalidade (CHAFEKAR; FIELDING, 2018).

A partícula viral de um coronavírus possui 4 estruturas comuns a todos os vírus dessa família: a espícula, que é a proteína de superfície ou *spike* (S) que se encontra inserida no envelope viral; a proteína transmembrana estrutural M que é integral do envelope viral e a proteína transmembrana do envelope (E); e o nucleocapsídeo, composto pela proteína do Nucleocapsídeo (N) diretamente associada ao genoma viral (FEHR; PERLMAN, 2015).

Essas 4 proteínas estruturais têm seus genes localizados no último terço do genoma, uma região com cerca de 10kb, junto com genes de proteínas acessórias. As proteínas acessórias são parte da identidade de cada vírus da família *Coronaviridae*, embora não sejam necessárias para a replicação *in vitro*, contribuem para a patogênese (WANG et al., 2020b). Os primeiros dois terços do genoma são ocupado pela ORF1a ORF1b, que codificam para várias 16 proteínas não estruturais, NSPs, que compõem o complexo de replicação. Nas extremidades, o genoma possui a região 5'UTR e 3' UTR, além de ser capeado na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3' (FEHR; PERLMAN, 2015; KIM et al., 2020).

A entrada do vírus na célula ocorre através da interação da proteína viral spike (S) com o seu receptor, que pode variar entre os coronavírus, e essa interação deflagra o processo de endocitose. É importante salientar que, embora o vírus entre por endocitose na célula, ele ganha acesso ao citoplasma com a fusão de membranas que ocorre com as vesículas endocíticas. (BURKARD et al., 2014; HU et al., 2021). Assim como SARS-CoV e HCov-NL63, o SARS-CoV-2 utiliza o receptor de angiotensina 2 (ACE-2) como receptor de entrada na célula (HOFFMANN et al., 2020; RASTOGI et al., 2020).

A proteína S é clivada no citoplasma, durante a biogênese das partículas virais, por furinas celulares em 2 subunidades, S1 e S2. A subunidade S1 é responsável pela ligação ao receptor do vírus, enquanto S2 promove a fusão com a membrana da célula hospedeira. Essa fusão é deflagrada, após a ligação de S1 com o receptor, a partir da clivagem de S2 por proteases celulares (serino protease transmembranares; ou do interior do endossoma Catapsinas B/L). Esse processo induz mudanças conformacionais no complexo S1\S2 e permite a fusão da membrana viral à membrana

do endossoma. No caso do SARS-CoV e do SARS-CoV-2, a protease encarregada de clivar S2 é uma serina protease transmembranar do tipo II, ou TMPRSS2 (GLOWACKA et al., 2011; HOFFMANN et al., 2020). Para o SARS-CoV-2, outras proteases podem desempenhar esse papel, como a própria furina, podendo ainda ser auxiliada pela tripsina (WALLS et al., 2020; XIA et al., 2020).

Uma vez no citoplasma, o RNA genômico viral é diretamente conduzido para a tradução. As ORF1a e ORF1b codificam duas poliproteínas, pp1a e pp1b respectivamente, que são proteoliticamente clivadas para produzir as NSPs (CHEN; YIU; WONG, 2020; KUMAR et al., 2020b). Dentre as NSPs está RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) do vírus. Uma particularidade dos vírus dessa família é que sua RpRd possui capacidade de revisão de bases, atividade exonucleose, o que reduz a taxa de mutação e permite a esses vírus ter um genoma RNA mais extenso comparado aos outros vírus de RNA (GAO et al., 2020).

A RpRd sintetiza, a partir do RNA genômico, a fita negativa de RNA complementar que servirá como molde para produzir mais fitas positivas, no processo de replicação do genoma, e os RNAs subgenômicos (RNAsg). Esses RNAsg também são capeados em 5' e poliadenilados em 3' e são transcritos por sequencias de regulação da transcrição, permitindo a transcrição descontínua (KIM et al., 2020; SAWICKI; SAWICKI; SIDDELL, 2007). As proteínas acessórias e as estruturais são sintetizadas a partir da tradução desses RNAsg.

As proteínas do nucleocapsídeo encapsulam o RNA genômico que é direcionado para o retículo endoplasmático junto com as outras proteínas estruturais, S, M e E. A montagem de novas partículas ocorre no complexo de Golgi e são liberadas da célula por exocitose (**Figura 10**) (FEHR; PERLMAN, 2015; RASTOGI et al., 2020; V'KOVSKI et al., 2021a).

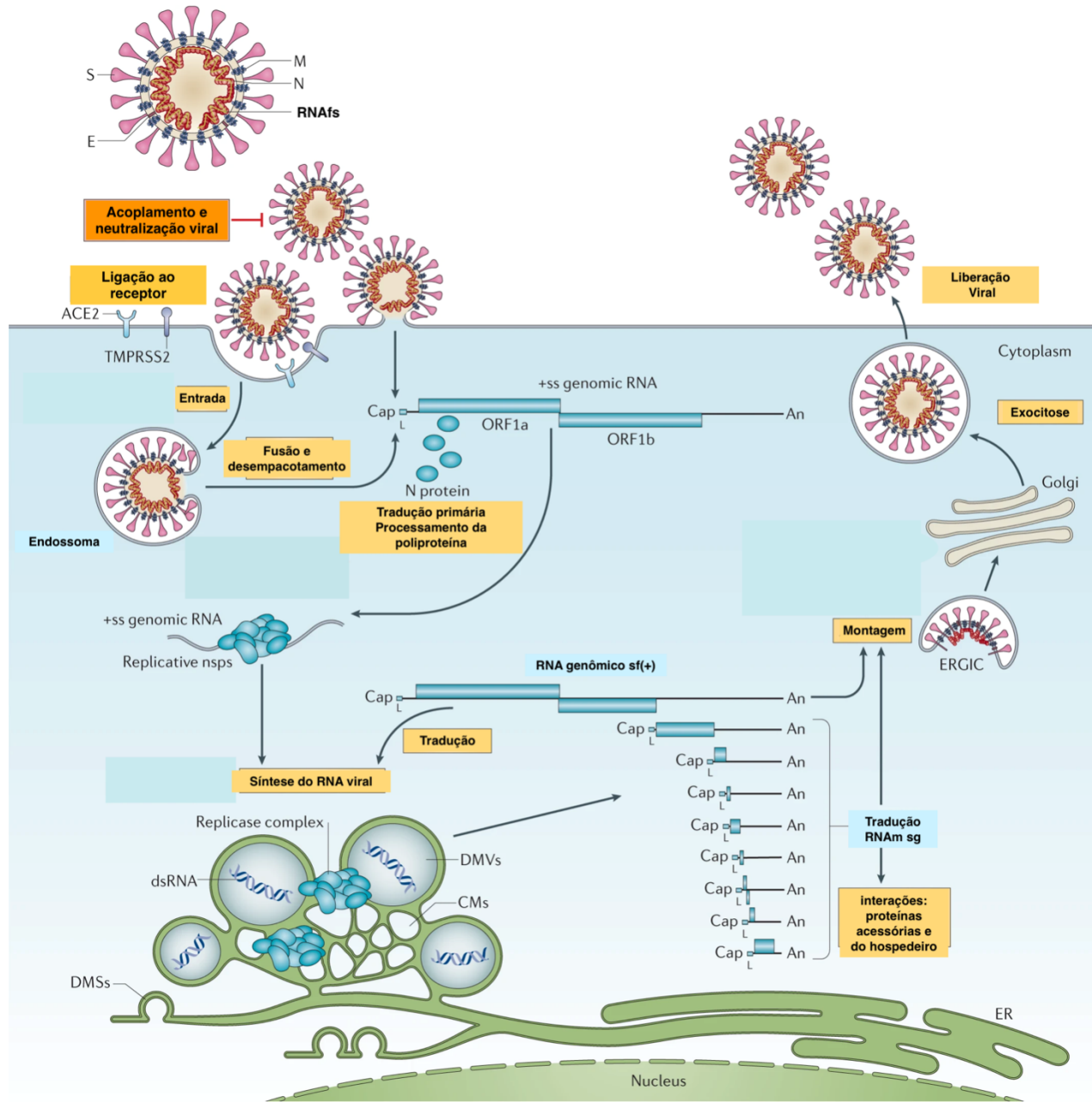


Figura 10 Ciclo replicativo dos coronavírus. As partículas dos coronavírus se ligam a fatores de acoplamento celulares e fazem interações específicas entre a proteína S e receptores celulares (como ACE-2). Além disso, junto com fatores do hospedeiro (como a serina protease de superfície celular TMRPSS2), promovem a adsorção e entrada do vírus na célula por fusão com a membrana celular ou do endossoma. Após a entrada, a liberação e descompactamento do RNA genômico viral, ele será disponibilizado para a tradução imediata de duas ORFs: ORF1a e ORF1b, resultado nas poliproteínas pp1a e pp1ab que são processadas *co* e *pós*-traducionalmente em proteínas não estruturais, NSPs, individuais que irão compor o complexo de replicação e transcrição. Ao passo que acontece a expressão das NSPs, ocorre a biogênese de organelas para a replicação viral que consistem em vesículas de dupla membrana (DMVs), membranas convolutas (CMs) e esferas pequenas abertas de membrana dupla (DMSs) que criam um microambiente protegido para a replicação genômica do RNA viral e transcrição dos RNAm subgenômicos (RNAm sg). As proteínas estruturais expressas a partir dos RNAm sg translocam através de membranas do retículo endoplasmático (RE) e transitam através do compartimento intermediário entre o ER e o Complexo de Golgi (ERGIC), onde interagem com proteína N-encapsidada e RNA genômico recém-sintetizado resultando em brotamento no lúmen de compartimentos de vesículas secretórias. Finalmente, os vírions são secretados das células infectadas por exocitose. Adaptado de V'Kovskiet *al.*, 2020.

1.7.1 A COVID-19

A doença causada pelo SARS-CoV-2, COVID-19 (do inglês, *coronavirusdisease 2019*), já fez mais de 4 milhões de vítimas fatais no mundo todo desde o início da pandemia em dezembro de 2019. A alta eficiência da transmissão viral pelo contato com fluidos respiratórios infectados, facilitou a dispersão do vírus para todas as partes do mundo. Estamos vivendo uma pandemia sem precedentes na história com graves consequências para a saúde pública e economia mundial.

Apesar do SARS-CoV-2 ser um vírus respiratório, tendo como sítio primário da infecção as células epiteliais do trato respiratório superior, a COVID-19 é uma doença sistêmica e multifacetada e a compreensão da sua patogênese é importante para nortear condutas de manejo clínico e terapêuticas (RAMOS-CASALS; BRITO-ZERÓN; MARIETTE, 2021). O indivíduo com a COVID-19 pode ser assintomático, apresentar sintomas inespecíficos leves ou moderados de uma síndrome gripal (80% dos casos), ou evoluir para a forma grave da doença com relevante comprometimento da função pulmonar (14% dos casos), e ainda em 5% dos casos o indivíduo entra na fase crítica podendo ir a óbito por síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e falência respiratória, na maioria dos casos de óbito, entretanto falência múltipla dos órgãos tem sido relatada com frequência (WU et al., 2020).

A partir da replicação viral no sítio primário da infecção, o SARS-CoV-2 migra para o trato respiratório inferior chegando aos alvéolos pulmonares, onde induz potente resposta inflamatória, levando a uma desregulação relacionada ao sistema imunológico, chamada síndrome de liberação de citocinas (*cytokine release syndrome*) com elevada liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios tendo como consequência principal o desencadeamento de inflamação sistêmica associado à falência múltipla de órgãos e alta mortalidade (MEHTA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2021).

Até o momento a única terapia medicamentosa para o tratamento da COVID-19 foi aprovada pelo FDA para uso em caráter de emergencial. O Remdesivir é um CAH-ProTide análogo

de adenosina de uso limitado à administração via endovenosa e indicado apenas para pacientes internados que apresentem as formas mais graves da doença (RUBIN et al., 2020).

2 JUSTIFICATIVA

Devido a necessidade de novas abordagens terapêuticas para prevenção e tratamento das infecções pelo vírus da dengue (DENV) e o vírus Zika (ZIKV), pesquisas que envolvem produção de vacinas e síntese de novas drogas estão sendo desenvolvidas como potenciais terapias antivirais (BERNATCHEZ et al., 2020; HALSTEAD, 2018; KAPTEIN; NEYTS, 2016; TIAN et al., 2018). Recentemente, uma vacina contra o DENV foi desenvolvida (CYD-TDV, Sanofi-Pasteur) e aprovada (HALSTEAD; RUSSELL, 2016; ROBINSON; DURBIN, 2017). Entretanto, essa vacina tem indicação de uso limitado, uma vez que ela não pode ser administrada a pessoas que não foram previamente infectadas. Uma série de tentativas de desenvolvimento de vacinas para a infecção pelo ZIKV foram iniciadas e algumas das candidatas demonstraram imunogenicidade durante os testes clínicos de fase I, com pelo menos duas delas seguindo para fase II. Mesmo assim, nenhuma delas seguiu para fase III (GIRARD et al., 2020).

Consequentemente, dado a circulação de ZIKV em regiões endêmicas para DENV e as semelhanças clínicas do início da infecção para ambos os vírus, o desenvolvimento de uma terapia baseada no uso de fármacos que podem ser utilizados como profiláticos, bem como para o tratamento das infecções por ZIKV e DENV seria de grande significância. Diversas tentativas têm sido feitas para o desenvolvimento das chamadas *smallmolecules*, tanto como inibidores não específicos, quanto como inibidores específicos da replicação do DENV (TIAN et al., 2018).

Todavia, até o momento nenhum desses inibidores foi aprovado para uso na clínica, seja devido ao perfil de toxicidade acima do aceitável, seja por ausência de eficácia (TIAN et al., 2018). Algumas dessas moléculas candidatas também foram testadas contra ZIKV, mas também com baixo potencial para uso clínico (BERNATCHEZ et al., 2020). Recentemente, o pró-fármaco Sofosbuvir, um pró-nucleotídeo análogo de uridina, aprovado pela agência regulatória Americana FDA para o tratamento da infecção pelo HCV, mostrou-se capaz de inibir a replicação de DENV e ZIKV *in vitro* com EC_{50} variando de 1,4 μ M a 9,9 μ M (BULLARD-FEIBELMAN et al., 2017;

MESCI et al., 2018; XU et al., 2017). Entretanto, o Sofosbuvir tem ação direcionada ao fígado e essa característica pode limitar a sua capacidade inibitória da replicação de DENV e ZIKV em outros tecidos.

O atual cenário globalizado marcado por contínua migração humana juntamente com o fato de que o SARS-CoV-2 pode ser transmitido de maneira eficiente através do contato entre humanos facilitou seu espalhamento. A doença causada pelo SARS-CoV-2 (COVID-19), declarada pela OMS como um problema de saúde pública de interesse internacional, já fez mais de 4 milhões de vítimas fatais no mundo todo. O cenário atual da pandemia reflete o potencial de emergência de novos vírus, e ainda que tenhamos vacinas, é necessário que sejam feitas pesquisas que visam o desenvolvimento de terapias medicamentosas.

Apesar dos avanços, o único medicamento aprovado, para uso em caráter emergencial, para o tratamento da COVID-19 é o Remdesivir, um análogo de adenosina de uso limitado à administração via endovenosa e indicado apenas para pacientes internados que apresentem as formas mais graves da doença (RUBIN et al., 2020). As vacinas licenciadas para prevenção da infecção pelo SARS-CoV-2 possuem variação entre suas eficácias, soma-se a isso a dificuldade de se fazer medidas de contenção, como distanciamento social, de forma efetiva e a grande dificuldade na logística de distribuição global de vacinas, comprometendo o acesso a elas principalmente nos países em desenvolvimento.

Sendo assim, existe uma significativa necessidade, ainda não alcançada, para o desenvolvimento de abordagens antivirais para o tratamento das infecções por DENV, ZIKV e SARS-CoV-2.

Os compostos pró-nucleotídeos utilizados aqui são todos análogos de guanosina, mas diferem em seu mecanismo de ação. Os compostos UMN-1002 e UMN-1002 são derivados estruturais do análogo de nucleosídeo 2'-C- β -Metilguanósina e compartilham o mecanismo de ação atuando como inibidores da RNA polimerase dependente de RNA dos vírus Zika e Dengue, portanto, são antivirais de ação direta. Os compostos 4Ei-10 e 4Ei-11 são análogos de cap (Me^7 -GTP),

e atuam através da ligação e sequestro do fator eucariótico de iniciação da tradução eIF4E, impedindo a iniciação da tradução pela via dependente de cap. Como esses vírus possuem a estrutura cap na extremidade 5' de seus genomas, entende-se que eles utilizam a via canônica dependente de cap para a síntese das suas proteínas. Dessa forma, investigaremos os compostos 4Ei-10 e 4Ei-11 através de sua atividade como antivirais de ação indireta.

O Efavirenz é um inibidor da transcriptase reversa do HIV-1 não análogo de nucleosídeo para o qual já existem evidências pré-clínicas de uso para o tratamento de outras doenças não relacionadas a infecções virais (COSTA et al., 2016; HECHT et al., 2017; PETROV et al., 2019). A existência de evidências obtidas por análise computacional de interação droga-alvo entre o EFV e proteínas do SARS-CoV-2, além de dados do nosso grupo que apontam atividade do EFV contra Chikungunya *in vitro* e *in vivo* nos levaram a testar a eficácia desse fármaco na infecção por SARS-CoV-2.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antiviral dos compostos pró-nucleotídeos (ProTides) inibidores da polimerase viral UMN-1001, UMN-1002 e o análogo de nucleosídeo parental 2'-C- β -Metilguanosina contra ZIKV e DENV. Investigar a atividade antiviral dos compostos pró-nucleotídeos antagonistas de eIF4E 4Ei-10 e 4Ei-11 contra ZIKV e SARS-CoV-2 e investigar a potencial atividade do Efavirenz contra SARS-CoV-2.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil citotóxico e os parâmetros farmacológicos dos compostos investigados contra DENV-2, ZIKV e SARS-CoV-2.
- Verificar a atividade antiviral de UMN-1001, UMN-1002 e 1 contra DENV e ZIKV em células Vero, HBMEC e SH-Sy5y.
- Confirmar a necessidade da atividade enzimática de Hint1 na ativação dos compostos ProTides UMN-1001 e UMN-1002.
- Investigar a atividade dos compostos UMN-1001, UMN-1002 e 1 contra o ZIKV *in vivo*.
- Verificar a atividade antiviral de 4Ei-11 contra ZIKV em células HEK293 e SH-Sy5y.
- Investigar a atividade antiviral de 4Ei-10 e 4Ei-11 contra SARS-CoV-2 em células Calu-3.
- Verificar a atividade do Efavirenz contra isolados do SARS-CoV-2 de diferentes linhagens em modelos celulares relevantes à patogênese da infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Culturas de células

Linhagem celular de endotélio microvascular cerebral humano (HBMEC), cedidas pelo Dr. Dennis J. Grab (The Johns Hopkins University, MD, USA) foram mantidas em Meio 199 (*ThermoFisher, EUA*), pH 7,4 e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*ThermoFisher, EUA*).

Células Vero (obtidas do ATCC® CCL81™) e Vero E6 (VERO C1008, Vero 76, clone E6, ATCC CRL-1586), linhagem celular de epitélio de rim de macaco verde africano, foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium- ThermoFisher, EUA*), pH 7,2, suplementado com 10% de SFB (*ThermoFisher, EUA*), 0,75% de bicarbonato de sódio, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen, EUA*).

Células BHK (*baby hamster kidney*) foram cultivadas em α -MEM (*Alpha-Minimum Essential Medium*) (*Applied Biosystems, EUA*), suplementado com 10% de SFB (*ThermoFisher*), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen, EUA*).

Células derivadas de neuroblastoma humano (SH-Sy5y), gentilmente cedidas pelo Dr. Amílcar Tanuri, (Instituto de Biologia, UFRJ), foram cultivadas em DMEM/F-12 (1:1) (*ThermoFisher*).

Células C6/36 (linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus*), gentilmente cedidas pela Dra. Andrea T da Poian (Instituto de Bioquímica Médica, IBqM, UFRJ) foram mantidas a 28°C em incubadora BOD (SOLAB), em meio Leibovitz (L-15) (*ThermoFisher, EUA*), pH 7,3, suplementado com 5% de SFB (*ThermoFisher, EUA*), 3% triptose fosfato (*ThermoFisher, EUA*), 7,5% de bicarbonato de sódio (*ThermoFisher, EUA*), 2% de L-glutamina, aminoácidos não essenciais 0,2 mM (*ThermoFisher, EUA*) e 1% de gentamicina 10 mg/ml (*ThermoFisher, EUA*).

Células derivadas de hepatocarcinoma celular humano, Huh-7, (obtidas do JCRB *cell bank* 0403) foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium- ThermoFisher, EUA*), pH 7,2, suplementado com 10% de SFB (*ThermoFisher, EUA*), 0,75% de bicarbonato de sódio, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen, EUA*).

Células de rim embrionado humano, HEK 293, (obtidas do ATCC CRL-1573) foram mantidas em DMEM (*ThermoFisher*, EUA), pH 7,2, suplementado com 10% de SFB, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen*, EUA).

Células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano, Calu-3, (obtidas do ATCC HTB-55) foram mantidas em DMEM baixa glicose (*ThermoFisher*, EUA), pH 7,2, suplementado com 10% de SFB, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen*, EUA).

Células de leucemia monocítica aguda humana, THP-1, (obtidas do ATCC TIB-202) foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640; *ThermoFisher*, EUA) suplementado com 10% de SFB, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen*, EUA).

Todas as células, com exceção das células C6/36, foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

4.2 Isolamento de monócitos humanos

Amostra de sangue de dois doadores diagnosticados como negativo para a infecção por SARS-CoV-2 foi obtida através do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental da UFRJ (no. 105/07). A partir da camada leucoplaquetária (*buffy coat*), as células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) foram obtidas por centrifugação utilizando Histopaque-1077 (*Sigma-Aldrich*) seguindo as recomendações do fabricante. O PBMC isolado foi cultivado em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen*, EUA) por 2 horas a 37°C com 5% de CO₂ para os monócitos aderirem à superfície da garrafa de cultura. Em seguida, o meio de cultura foi removido junto com as células que não aderiram. Os monócitos foram soltos da superfície da garrafa com tripsina (*ThermoFisher*, EUA), contados e infectados com SARS-CoV-2 logo em seguida por *spinoculation*.

4.3 Vírus

4.3.1 Vírus da dengue e Zika vírus

A cepa Asiática 16681 do sorotipo 2 do vírus da dengue (DENV2) foi gentilmente cedida pela Dra. Andrea T. Da Poian (Instituto de Bioquímica Médica, IBqM, UFRJ). A amostra de vírus Zika (KX197192) foi isolada de um paciente em Pernambuco/BR (ZIKV-BR_{PE243}) e gentilmente cedida pelo Dr. Ernesto T. A. Marques Jr. (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Pernambuco). Os vírus foram propagados em células C6/36 em meio L-15. Quando as células atingiram 70% de confluência, o meio metabolizado foi removido da garrafa, em seguida as células foram lavadas com PBS 1X (*phosphatebuffered saline* [NaCl 136 mM; KCl 2,6 mM; Na₂HPO₄ 11,6 mM; KH₂PO₂ 2,3 mM]) e incubadas com DENV2 ou ZIKV-BR_{PE} em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05 e 0,01, respectivamente, em um volume de 5 ml de meio L-15 sem SFB por 1 hora e 30 minutos a 28°C, com agitações suaves a cada 15 minutos de modo a permitir adsorção homogênea do vírus às células. Depois do período de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS 1X e cultivadas em meio L-15 suplementado com 2% de SFB por 9 dias em estufa a 28°C. Após esse período, o meio de cultura foi coletado e centrifugado (1.500 RPM por 5 minutos) para remoção de debris celulares e filtrado em filtro de 0,22 µm e o sobrenadante contendo os vírus foi armazenado a -80°C.

4.3.2 SARS-CoV-2

Os experimentos com SARS-CoV-2 foram realizados com 3 isolados de diferentes linhagens a partir de amostras de swab de nasofaringe coletados de indivíduos sintomáticos coletadas no Centro de Testagem e Diagnostico de COVID-19 da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) Aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (CAAE: 30161620.0.0000.5257). Os diferentes isolados são referidos nesse trabalho como: SARS-CoV-2 545 (linhagem B.1.1.33), SARS-CoV-2 814 (linhagem P.2) e SARS-CoV-2 RJ1 (linhagem A2).

Para isolamento do RJ1, células Vero E6 foram cultivadas em garrafas T25 (75 cm² de área de superfície) e mantidas a 37 °C e 5% CO₂ até atingir confluência de 50%. No dia seguinte, as células foram infectadas com 250 µL do meio de transporte viral (contido no swab da nasofaringe) diluído em DMEM sem suplementação com SFB por 1 hr para permitir adsorção viral. Após essa incubação, o inóculo foi removido e adicionado DMEM suplementado com 5% de SFB. As células foram mantidas a 37 °C e 5% CO₂ por 72 hrs. O meio de cultura foi coletado e filtrado através de um filtro de 0.22 µM (*Merck Millipore*) para remover os debris celulares. Os estoques virais foram armazenados em alíquotas a -80 °C. A quantidade de partículas virais infecciosas por mL dos estoques foi determinada através do ensaio de formação de placa e o RNA viral foi extraído e enviado para o Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, Petrópolis, RJ) onde foi realizado o sequenciamento por *next generation* e identificado (no. de acesso GSAID). Os isolados SARS-CoV-2 545 e 814 foram sequenciados diretamente de amostras de swab de nasofaringe pelo LNCC ((VOLOCH et al., 2021). Na **tabela 1** estão apresentadas as diferenças em aminoácidos de três regiões distintas do genoma dos isolados de SARS-CoV-2 utilizados nesse trabalho.

Tabela 1 Análise das mutações presentes nos isolados de SARS-CoV-2 utilizados no estudo

	Amostra (linhagem)	Selvagem*	RJ1 (A2)	545 (B.33)	814 (P2)
Gene	Posição aminoácidos				
ORF1ab	110	H	H	H	H
	419	K	K	K	K
	1810	P	P	L	P
	2089	E	E	E	E
	3071	F	Y	F	F
	3468	L	L	L	V
	3610	A	A	A	A
	3930	L	L	L	F
	4502	W	W	W	W
	4847	T	I	T	T
	5158	S	S	S	S
	5284	M	M	M	M
	5541	T	T	T	T
	5857	L	L	L	L
	6016	S	S	S	S
	6074	S	S	L	S
	6802	H	R	R	R
	6805	Q	R	R	R
	S	22	T	T	T
68		I	I	I	I
80		D	D	D	D
138		D	D	H	D
197		I	V	I	I
484		E	E	E	K
614		D	D	G	G
846		A	A	A	A
1101		H	H	H	H
1176		V	V	V	F
N	119	A	A	A	S
	142	P	P	P	P
	195	R	R	R	R
	197	S	L	S	S
	203	R	R	K	K
	204	G	G	R	R
	234	M	M	M	I
	251	A	A	A	A
	292	I	I	T	I
	379	T	T	T	T
	413	S	S	S	S

Comparação entre os aminoácidos de três regiões do genoma do SARS-CoV-2 dos isolados utilizados no estudo em relação à linhagem selvagem WIV04. * Foi considerada a sequência hCoV-19/Wuhan/IVDC-HB-05/2019|EPI_ISL_402121|2019-12-30 (n° de acesso no GISAID: EPI_ISL_402121) como selvagem.

4.4 Ensaio de formação de placa

4.4.1 Titulação da partícula viral infecciosa de DENV2

A titulação do DENV2 foi feita através da técnica de titulação por ensaio de placa. Células BHK foram cultivadas em placas de 24 poços (4×10^4 células/poço), em meio Alfa-MEM (*Applied Biosystems, EUA*), suplementado com 10% de SFB (*ThermoFisher, EUA*), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen, EUA*), e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas até atingir confluência de 70%. No dia seguinte, o meio foi removido e a monocamada foi incubada com 200 µl do inóculo de DENV2 em diluições seriadas na base 10. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C para adsorção viral. Em seguida, o inóculo foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X para remover as partículas virais não adsorvidas. Após as lavagens, foi adicionado 1 ml de Alfa-MEM suplementado com 1% de carboximetilcelulose (CMC), 1% de SFB e 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 7 dias. Após esse período as células foram fixadas com formaldeído 10% em PBS 1X por 6 horas, em seguida o meio semissólido contendo CMC e formaldeído foi removido de cada poço por lavagem com água corrente. A formação da placa pelo vírus foi observada na monocamada de células através da coloração com solução de cristal violeta 1% em metanol 20%. As placas formadas pelo vírus foram expressas em Log das unidades formadoras de placa por ml (PFU/ml [Log]).

4.4.2 Titulação da partícula viral infecciosa de ZIKV

A titulação do ZIKV também foi feita através por ensaio de placa. Células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços (4×10^4 células/poço), em meio DMEM (*ThermoFisher, EUA*), suplementado com 10% de SFB (*ThermoFisher, EUA*), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen, EUA*), e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas até

atingir confluência de 70%. No dia seguinte, o meio foi removido e a monocamada foi incubada com 200 µl do inóculo de ZIKV-BR_{PE} em diluições seriadas na base 10. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C para adsorção viral. Em seguida, o inóculo foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X para remover as partículas virais não adsorvidas. Após as lavagens, foi adicionado 1 ml de DMEM suplementado com 1,5% de carboximetilcelulose (CMC), 1% de SFB e 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 5 dias. Após esse período as células foram fixadas com formaldeído 10% em PBS 1X por 6 horas, em seguida o meio semissólido contendo CMC e formaldeído foi removido de cada poço por lavagem com água corrente. A formação da placa pelo vírus foi observada na monocamada de células por coloração com solução de cristal violeta 1% em metanol 20%. As placas formadas pelo vírus foram expressas em Log das unidades formadoras de placa por ml (PFU/ml [Log]).

4.4.3 Titulação da partícula viral infecciosa de SARS-CoV-2

Células Vero E6 foram plaqueadas em placas de 12 poços e mantidas em meio DMEM (*ThermoFisher, EUA*), suplementado com 10% de SFB (*ThermoFisher, EUA*), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*Invitrogen, EUA*), e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas até atingir confluência de 100%. No dia seguinte, o meio foi removido e a monocamada foi incubada com 200 µl do inóculo de SARS-CoV-2 em diluições seriadas na base 10. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C para adsorção viral. Em seguida, o inóculo foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X para remover as partículas virais não adsorvidas. Após as lavagens, foi adicionado 1 ml de DMEM suplementado com 1,4% de carboximetilcelulose (CMC), 1% de SFB e 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 4 dias. Após esse período as células foram fixadas com formaldeído 10% em PBS 1X por 6 horas, em seguida o meio semissólido contendo CMC e formaldeído foi removido de cada poço por lavagem com água corrente. A formação da placa pelo vírus foi observada na monocamada de células por coloração

com solução de cristal violeta 1% em metanol 20%. As placas formadas pelo vírus foram expressas em Log das unidades formadoras de placa por ml (PFU/ml [Log]).

4.4 Infecção das células

4.4.1 Infecção com *DENV* e *ZIKV*

Células Vero e HBMEC ($1,92 \times 10^6$ células/por placa) cultivadas em placas de 24 poços, foram infectadas com DENV2 (MOI 0,2). Células Vero, HBMEC e SH-Sy5y foram incubadas com ZIKV (MOI 0,05, 0,5 e 1,0, respectivamente) em meio de cultura específico para cada linhagem celular (i.e. DMEM para células Vero e M199 para HMBEC), sem suplementação com SFB, em um volume de infecção de 200µl por poço e mantidas por 1 hora e 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂, sob agitação suave a cada 20 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1X para remoção das partículas virais não adsorvidas e cultivadas no meio de cultura específico para cada célula e suplementado com 5% de SFB. As células da condição controle passaram pelo mesmo procedimento, porém na ausência de vírus.

4.4.2 Infecção com *SARS-CoV-2*

Células Vero E6, Calu-3 e Huh-7 foram cultivadas em plaqueadas ($1,2 \times 10^6$ células/por placa) e, vinte e quatro horas depois, foram infectadas com SARS-CoV-2 (MOI 0,1) em meio de cultura específico para cada linhagem celular, sem suplementação com SFB, em um volume de infecção de 200 µl por poço e mantidas por 1 hora e 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂, sob agitação suave a cada 20 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1X para remoção das partículas virais não adsorvidas e cultivadas no meio de cultura específico para cada célula e suplementado com 10% de SFB.

As células THP-1 e os monócitos primários foram infectados por *spinoculation*. Para isso, $1,5 \times 10^6$ células foram diluídas em meio de cultura específico, na ausência de SFB, contendo o vírus (MOI 0,1) e submetidas a centrifugação a 12.000g por 1h30 min. Após a centrifugação, o

sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB e, nas condições de tratamento, contendo as drogas na concentração específica. Em seguida, as células foram divididas em igual volume aos poços das placas de cultura. As células da condição controle (Não tratado) passaram pelo mesmo procedimento, porém na ausência de vírus.

4.5 Drogas

Para avaliação da atividade antiviral contra DENV e ZIKV, nós utilizamos os pró-nucleotídeos: 2'-C- β -metilguanositriptaminafosforamidatomoéster (UMN-1001), 2(metiltioetil) triptaminafosforamidatodiéster (UMN-1002) e o análogo de nucleosídeo parental 2'-C- β -Metil-Guanosina (1). Os compostos UMN-1001 e UMN-1002 são pró-nucleotídeos sintetizados a partir da molécula do 2'-C- β -Metil-Guanosina, por tanto, todos são análogos de guanosina. Para inibir a atividade enzimática da proteína Hint1, enzima necessária para a ativação dos compostos UMN-1001e UMN-1002, nós utilizamos o composto guanosina-5'-triptamina carbamato (TrpGc) (BARDAWEEL; GHOSH; WAGNER, 2012)

Os inibidores da iniciação da tradução testados contra ZIKV e SARS-CoV-2 são membros da classe dos ProTides e são análogos de guanosina. 4Ei-10 [2-(metiltio)etil N7-(p-clorofenoxietil) guanosina 5'-monofosfato] e 4Ei-11 [2-(metiltio)butil N7-(p-clorofenoxietil) guanosina 5'-monofosfato]. Todos os ProTides foram gentilmente cedidos, em forma de pó liofilizado, pelo Professor Carston R. Wagner do Departamento de Química Medicinal, Faculdade de Farmácia da Universidade de Minnesota – EUA.

O Efavirenz (EFV) foi obtido de Bio-Manguinhos/Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

As drogas foram diluídas em dimetilsulfóxido 1% (DMSO) e armazenadas a -80°C, como solução a 20 mM de cada composto e diluídas no meio de cultura específico para cada célula, ou em DMEM para os experimentos *in vivo*, no momento do experimento.

4.6 Ensaios de citotoxicidade

A concentração máxima não tóxica das drogas 1, UMN-1001 e UMN-1002, foi determinada através do método de incorporação do vermelho neutro. Esse é um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade de células baseado na absorção do vermelho neutro, um corante que se acumula nos lisossomos de células viáveis não danificadas (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988). Para isso, $2,0 \times 10^6$ células foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS 1X, depois foram incubadas com os compostos em concentrações que variaram entre 100 e 25 µM, em triplicatas, mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas. Esse tempo corresponde ao mesmo período máximo do tratamento das células infectadas durante os experimentos.

Ao final do tratamento o meio foi removido e adicionado 100 µL da solução de vermelho 0,05% em meio suplementado com 10% de SFB. As placas foram levadas à estufa a 37°C por três horas para a incorporação do VN. Em seguida, a solução de vermelho neutro foi retirada e as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com formaldeído 20% em PBS 1X durante cinco minutos. Foi utilizada a solução de metanol 50% + ácido acético 1% por 30 minutos para extrair o corante incorporado. Após esse período, a absorbância do meio foi determinada por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 490 nm. A média das absorbâncias das condições experimentais sem tratamento foi utilizada como referência de 100% de viabilidade.

O perfil de toxicidade celular para as drogas EFV, 4Ei-10 e 4E-11 foi determinado através um ensaio colorimétrico de metabolização do. Composto tetrazólio. [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] (MTS) utilizando o kit *Cell Titer Aqueous One* (Promega, USA) seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, cada droga foi diluída no meio de cultura específico de cada célula em concentrações variando de 100 a 0,093 µM. As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas que foi o tempo máximo de tratamento com os

compostos. Ao final deste período, foi adicionado 20 μL da solução do kit a cada poço de uma placa de 96 poços contendo as células tratadas ou não com cada um dos compostos avaliados. A placa foi mantida a 37°C e 5% de CO_2 entre 1 e 2 horas, o tempo varia de acordo com a capacidade de cada linhagem celular metabolizar o MTS. Quando foi observada a variação da cor do meio, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 490 nm.

A condição de 100% de viabilidade celular foi conseguida utilizando células não tratadas com as drogas, mas cultivadas apenas em seu meio de cultura específico. Esse ensaio foi realizado três vezes sendo feitas análises em triplicatas para cada concentração de droga.

4.7 Avaliação da atividade antiviral

4.7.1 Atividade antiviral dos ProTides inibidores da polimerase viral contra DENV e ZIKV

Células Vero, HBMEC e SH-Sy5y (4×10^4 células por poço) foram cultivadas em placa de 24 poços e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 horas até atingirem confluência de aproximadamente 70% da monocamada. Em seguida, as células foram infectadas com DENV2 (MOI 0,2) ou ZIKV-BR^{PE} (MOI 0,05 para Vero ou 0,5 para HBMEC e 1,0 para SH-Sy5y) como citado anteriormente no tópico 4.4.1. Após a infecção, as células foram incubadas com UMN-1001, UMN-1002 e com o análogo de guanosina parental (1) na concentração máxima não tóxica pré-determinada. Em células Vero, todos os compostos foram utilizados na concentração 100 μM , enquanto em células HBMEC, o ProTide UMN-1002 foi utilizado a 25 μM e para SH-Sy5y o mesmo composto foi utilizado a 50 μM . A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por até 72 horas, sendo observada diariamente, em microscópio óptico, para verificação de efeito citopático associado à infecção viral e comparação com as células controle não infectadas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para titulação viral por ensaio de placa e extração de RNA seguido de síntese de cDNA e PCR quantitativo (qPCR) para cálculo da porcentagem de redução da replicação viral frente ao tratamento com os compostos estudados e para a construção da curva de RNA equivalente ao PFU.

4.7.2 Avaliação do papel de Hint1 na ativação dos ProTides UMN-1001 e UMN-1002

Células Vero (4×10^4 células por poço) foram cultivadas em placas de 24 poços e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas até atingirem confluência de aproximadamente 70% da monocamada. Em seguida, as células foram infectadas com DENV-2 (MOI 0,2) como descrito no tópico 4.4.1. Após a infecção, as células foram incubadas com as drogas UMN-1001, UMN-1002 e com o análogo de guanosina parental (1) na concentração máxima não tóxica pré-determinada (100 µM). As células também foram incubadas em condições de presença do ProTide e do inibidor farmacológico de Hint1 (TrpGc) a 25 µM. A placa foi mantida a 37 °C com 5% de CO₂ por 72 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para titulação viral por ensaio de placa e extração de RNA seguido de síntese de cDNA e PCR quantitativo para construção da curva de RNA equivalente ao PFU.

4.7.3 Atividade antiviral dos ProTides inibidores da iniciação da tradução via cap-dependente contra ZIKV e SARS-CoV-2

Células HEK 293 foram cultivadas em placas de 96 poços ($1,5 \times 10^6$ /placa) e mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas até atingirem confluência de aproximadamente 70% da monocamada. Em seguida, as células foram tratadas com 4Ei-11 diluído em uma faixa de diferentes concentrações variando de 25 µM a 0,19 µM, com cada concentração sendo a metade da anterior a partir de 25 µM. O pré-tratamento das células durou 4 horas e, em seguida, os sobrenadantes foram removidos e substituídos pelo inóculo de ZIKV-BR^{PE} (MOI 0,1), contendo também a droga, por 1hr. Após o período de adsorção viral, o inóculo foi removido, a monocamada foi lavada com PBS 1X e o ProTide 4Ei-11 foi readicionado à cultura nas mesmas concentrações. A placa foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ por 72 horas. Após esse período, foi realizada a determinação da viabilidade celular utilizando o kit *Cell Titer Aqueous One* (Promega, USA). A interpretação da atividade antiviral do 4Ei-11 contra ZIKV em HEK 293 foi feita através da observação da capacidade do tratamento prevenir ou reduzir a mortalidade celular causada pela infecção.

O mesmo protocolo foi aplicado às células SH-Sy5y, entretanto para essas células, a infecção com ZIKV foi feita em um MOI de 1,0 e o tratamento com 4Ei-11 foi realizado em uma faixa de diferentes concentrações variando de 100 μM a 1,56 μM , com cada concentração sendo a metade da anterior a partir de 100 μM . A interpretação da atividade antiviral do 4Ei-11 contra ZIKV em SH-Sy5y foi feita através da observação da capacidade do tratamento em prevenir ou reduzir os danos à viabilidade celular causados pela infecção e pela quantificação das partículas virais infecciosas no sobrenadantes através do ensaio de formação de placa.

Para os experimentos com 4Ei-10 e 4Ei-11 contra SARS-CoV-2, foram utilizadas as células Calu-3. As células foram cultivadas em placas de 96 poços (1,5 x 10⁶/placa) e mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas até atingirem confluência de aproximadamente 70% da monocamada. Em seguida, as células foram pré-tratadas por 4 horas com ambas as drogas em concentrações variando de 3 μM a 0,093 μM , com cada concentração sendo a metade da anterior a partir de 3 μM . As células foram infectadas com SARS-CoV-2 (MOI 0,1) na presença das drogas por 1hr. Após esse período, o inóculo foi removido, a monocamada foi lavada com PBS 1X e as drogas foram adicionadas à cultura nas mesmas concentrações. A placa foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ por 48 horas, com os sobrenadantes sendo coletados nos pontos de 24 e 48 horas pós-infecção (hpi). Os sobrenadantes foram utilizados para titulação viral por ensaio de formação de placa e as células foram fixadas e preparadas para identificação de RNAdf e a presença da proteína Spike por imunofluorescência.

4.7.4 Atividade antiviral do Efavirenz contra SARS-CoV-2

A atividade antiviral do EFV foi avaliada utilizando células Vero E6, Huh-7, Calu-3, THP-1 e monócitos humanos primários. Todas as células foram infectadas com MOI 0,1 como descrito anteriormente no tópico 4.5.2. Para células Calu-3 foram testados isolados virais pertencentes às linhagens B.1.1.33, P2 e A2, enquanto as demais células foram infectadas com o isolado SARS-CoV-2 RJ1, da linhagem A2. As células THP-1 e os monócitos primários foram infectadas por *spinoculation*. Após a infecção, foi adicionado EFV na concentração de uso que variou entre as

células. O tratamento das células Vero E6 foi feito com EFV com diferentes concentrações variando entre 30 μM e 2,5 μM , com cada concentração sendo a metade da anterior a partir de 30 μM . Nessas células, os sobrenadantes foram coletados em 24 e 48 hpi para avaliação da atividade antiviral e construção das curvas de EC_{50} pelo ensaio de formação de placas. Para as células Huh-7, o tratamento foi feito com EFV a 5 μM e 10 μM . Os sobrenadantes foram coletados em 24 e 72 hpi e processados para a detecção do RNA genômico do SARS-CoV-2 por qPCR. Para Calu-3, o tratamento foi feito com EFV a 10 μM e os sobrenadantes e as células foram coletados em 24 e 48 hpi e submetidos ao ensaio de formação de placa para quantificação das partículas virais infecciosas e processados para a detecção do RNA genômico do SARS-CoV-2 no sobrenadante e do RNAsg do SARS-CoV-2 por qPCR. Para o cálculo do percentual de inibição do RNAsg do SARS-CoV-2 nos lisados, os valores de Ct das condições infectado e infectado+tratado foram normalizados pelo Ct do GAPDH seguido do cálculo do ΔCt . As células THP-1 foram tratadas com EFV a 10 μM e 15 μM . Os sobrenadantes foram coletados em 48 e 72 hpi e submetidos ao ensaio de formação de placa para quantificação das partículas virais infecciosas. Os monócitos humanos primários foram tratados com EFV a 5 μM e 10 μM . Os sobrenadantes dessas culturas, bem como as células, foram coletados em 72 hpi e submetidos ao ensaio de formação de placa para quantificação das partículas virais infecciosas e processados para a detecção do RNA genômico do SARS-CoV-2 no sobrenadante e do RNAsg do SARS-CoV-2 por qPCR.

4.8 Síntese de cDNA e qPCR para os experimentos com DENV e ZIKV

O RNA viral foi isolado a partir de 200 μL de sobrenadante, coletado nos tempos pós-infecção estabelecidos nos tópicos anteriores, utilizando o reagente TRIzol™ (*ThermoFisher, EUA*), de acordo com as instruções do fabricante, obtendo volume final de 20 μL de RNA viral. Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), utilizamos 7,0 μL do RNA viral adicionados a 3,0 μL do mix do kit *High-Capacity DNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems, EUA*), utilizando

oligonucleotídeos iniciadores randômicos de acordo com as instruções do fabricante, submetendo a amostra ao ciclo como mostra a **tabela 2**.

Tabela 2 Condições de temperatura e tempo para obtenção do cDNA

Temperatura	Tempo
25°C	10 minutos
37°C	120 minutos
85°C	5 minutos

O DNA sintetizado (7µl), como citado no tópico anterior, foi submetido à PCR em tempo real para a detecção e quantificação do material genético viral utilizando o kit *TaqmanMasterMixReagents* (*Applied Biosystems, EUA*) e o aparelho *Real Time PCR System 7300* (*Applied Biosystems, EUA*), submetendo as amostras aos seguintes ciclos para DENV e ZIKV como mostra a **tabela 3.**:

Tabela 3 Ciclagem da PCR em tempo real para DENV e ZIKV

Temperatura	Tempo
50°C	2 minutos
95°C	10 minutos
95°C	15 segundos
60°C	1 minuto

} 40x

Para a construção da curva-padrão para a quantificação do RNA viral equivalente ao PFU, primeiro foi realizada a extração do RNA a partir de um estoque de concentração (PFU/ml) conhecida de cada vírus. Em seguida, o RNA extraído foi submetido a diluição seriada na base 10, de 10^0 a 10^{-5} seguido de síntese do cDNA e qPCR. Consideramos que a concentração em PFU/ml reduz proporcionalmente 10 vezes a cada diluição do RNA viral. Dessa forma, construímos uma curva-padrão logarítmica ($R^2 > 0.9$) para obtermos o valor de RNA equivalente a cada Ct (*cyclethreshold*). Os resultados estão apresentados como a média e desvio padrão de pelo menos

três experimentos independentes. A sequência de todos os primers e sondas utilizadas para o ensaio de PCR tempo real estão descritas na **tabela 4**.

Para calcular a porcentagem de inibição da replicação viral, primeiro nós obtivemos o valor da quantidade de replicação viral através da fórmula: $2^{Ct(Cp)-Ct(amostra)}$ =quantidade de replicação (onde $Ct[Cp]$: *Threshold cycle* do controle de vírus sem tratamento e $Ct[amostra]$ = *Thres hold cycle* da amostra com o tratamento). Usa-se 2 pois assume-se que o PCR quantitativo tem 100% de eficiência. Logo para o nosso controle de replicação viral, a quantidade de replicação será 1 ($Ct_{cp}-Ct_{cp}=0$; $2^0=1$), ou 100%. Para calcular a porcentagem de inibição nós subtraímos a quantidade de replicação do controle da quantidade de replicação de cada amostra.

Tabela 4 Sequência de iniciadores e sondas utilizados para o ensaio de PCR em tempo real

Iniciador	Orientação	Sequência	Região de anelamento no genoma
ZIKV F.	Senso	5'-CCG CTG CCC AAC ACA AG-3'	1086
ZIKV R.	Antisenso	5'-CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT-3	1162
ZIKV- Sonda	-	5'- AGCCT ACC TTG ACA AGC AGT CAG ACA CTC AA-3'	1107
DEN 2 F	Senso	5'-CAGGTTATGGCACTGTCACGAT-3'	1605
DEN 2 C	Antisenso	5'-CCATCTGCAGCAACACCATCTT-3'	1583
DEN 2 Sonda	-	5'-CTCTCCGAGAACAGGCCTCG-3'	1008

4.9 Síntese de cDNA e qPCR para os experimentos *in vitro* com SARS-CoV-2

Os lisados celulares foram coletados com tampão RIPA (Tris-Cl 10 mM [pH 8,0]; EDTA 1 mM; EGTA 0,5 mM; Triton X-100 1%; Desoxicolato sódico 0,1%; SDS 1%; NaCl 140 mM) suplementado com um coquetel de inibidores de protease (Sigma). O RNA total foi extraído de 200 µL do lisado celular, ou do sobrenadante das culturas, com TriZol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Sete µL do RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA que foi realizada utilizando o kit *High-capacityDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher) utilizando oligonucleotídeos randômicos como primers. Os primers e sondas para o gene N1 do SARS-CoV-2 foram sintetizados com a química de *primetime* pela *Integrated DNA Technologies* (IDT) de acordo com as sequências obtidas do CDC, EUA. A amplificação foi feita pelo sistema StepOne™ Real-Time PCR utilizando TaqMan Mix (ThermoFisherScientific). Para quantificação dos transcritos de RNA do gene N, nós fizemos uma diluição seriada na base 10 com um RNA padrão de número de cópias por µL conhecido sintetizado pela IDT de acordo com as sequências obtidas do CDC, EUA. Esses resultados estão expressos como SARS-CoV-2 no. de cópias RNA/mL.

4.10 Detecção do RNA subgenômico do SARS-CoV-2 por RT-qPCR

A detecção do RNA subgenômico (RNAsg) foi feita utilizando o sistema GoTaq®Probe-1-Step RT -qPCR (Promega). Cada reação conteve: 10µL de GoTaqprobeqPCR master mix; 0,4 µL de GoScript RT mix; 0,08µL de 100 µM do primer senso; 0,08 µL de 100µM do primer antisenso; 0,04µL de 100µM da sonda; 4,4 µL de água livre de nucleasse e 5uL de RNA. As reações foram submetidas às ciclagens no aparelho Aria MX (Agilent) de acordo com a seguinte programação: 45°C por 15 minutos; 95°C por 2 minutos; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 53°C por 30 segundos. A análise das amostras foi feita utilizando um *threshold* de 0.01. As sequências dos iniciadores (primers) e da sonda estão descritos na **tabela 5**.

Tabela 5 Sequência de iniciadores e sonda utilizados para o ensaio de PCR em tempo real para detecção do RNAsg* do SARS-CoV-2

Subgenômico	Primer	Sequência (5' – 3')
E	FwsgRNAE (senso)	CGA TCT CTT GTA GAT CTG TTC TCT AAA CGA ACT TAT GTA CTC
	Gene E_Sarbeco_R2 (antisenso)	ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A

Sonda

Subgenômico		Sequência	Sonda	Quencher
E	E_Sarbeco_P2	ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG	FAM	Iowa Black

*RNAsg= RNA subgenômico

4.11 Curvas concentração-efeito e determinação de EC₅₀

Para a obtenção da curva concentração-efeito dos ProTides contra DENV foram utilizadas células Vero, enquanto para o ZIKV foram utilizadas as células Vero, HBMEC e SH-Sy5y. As células foram infectadas e incubadas com os compostos em concentrações que variaram de 0,8 a 100 µM (para UMN-1001, UMN-1002 e 1. A replicação viral foi mensurada por qPCR como citado anteriormente. A determinação do valor de EC₅₀ contra ZIKV também foi determinada em células SH-Sy5y pela redução da quantidade de partículas virais infecciosas pelo ensaio de placa. O EC₅₀ do EFV contra SARS-CoV-2 foi realizado em células Vero E6, incubadas com EFV em concentrações variando entre 30 µM e 2,5 µM e infectadas com SARS-CoV-2 como citado nos tópicos anteriores. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos ao ensaio de formação de placa.

Os valores da concentração de fármaco que induz metade do efeito máximo (EC_{50}) foram obtidos pela curva de regressão de Hill através de interpolação logarítmica dos dados utilizando o *software GraphPad Prism* versão 6.0. O experimento foi feito em triplicata.

4.12 Imunofluorescência

Células HBMEC e SH-Sy5y foram cultivadas em lamínulas (4×10^4 células/lamínula) e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 . No dia seguinte, as células foram infectadas com ZIKV (MOI 0,5 e 1,0, respectivamente) e incubadas com UMN-1001, UMN-1002 e 1 nas suas concentrações máximas não tóxicas pré-estabelecidas por 18 horas. Células Calu-3 foram cultivadas em placas de 96 poços ($1,5 \times 10^6$ células/placa). No dia seguinte, as células foram infectadas com SARS-CoV-2 (MOI 0,1) e tratadas com 4Ei-10 e 4Ei-11 em concentrações variando de $3 \mu\text{M}$ a $0,093 \mu\text{M}$ por 24 e 48 horas. Após as 18 horas para ZIKV e 24 e 48 horas para SARS-CoV-2, os sobrenadantes foram removidos e as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% em PBS 1X por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% (Sigma-Aldrich) e BSA 3% (Sigma-Aldrich) em PBS 1X por 25 minutos à temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal IgG2a anti-RNAdf J2 (Scicons, EUA) e anticorpo anti-Spike do SARS-CoV-2 produzido por imunização em cavalos, gentilmente cedido pelo Prof. Amilcar Tanuri; Depto de Biologia – UFRJ (CUNHA et al., 2021), diluídos 1:1000 em Triton X-100 0,2% e BSA 3% em PBS 1X por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período as células foram incubadas a 37°C por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas com anticorpo IgG conjugado com AlexaFluor 488 (ThermoFisherScientific), para detecção do RNAdf de ZIKV e Spike do SARS-CoV-2 ou com IgG conjugado com AlexaFluor 594 (ThermoFisherScientific) para detecção do RNAdf do SARS-CoV-2 diluídos 1:1000 em PBS por 40 minutos à temperatura ambiente e lavadas 3 vezes com PBS 1X seguido da incubação com DAPI (Invitrogen) para marcar os núcleos. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 710 para os experimentos

com ZIKV. As células infectadas com SARS-CoV-2 foram analisadas por triagem de alto conteúdo (*High Content Screening*) utilizando o microscópio ImageXpress Ultra com o software MetaXpress versão 4.0.0.42 (2012) – Molecular Devices.

4.13 Western blot

Lisados das células Vero E6 e Calu-3, infectadas ou não (mock) com SARS-CoV-2 foram coletados com tampão RIPA (Tris-Cl 10 mM [pH 8.0]; EDTA 1 mM; EGTA 0.5 mM; Triton X-100 1%; Deoxicolato de sódio 0.1%; SDS 0.1%; NaCl 140 mM) adicionado de inibidores da protease (Sigma Aldrich) 24 horas pós-infecção. As proteínas foram fracionadas por gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana PVDF (Hybond-ECL, GE Healthcare), utilizando o sistema de transferência molhada (BioRad). As membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-Spike (S1 NTD) do SARS-CoV-2 (56996S, Cell Signaling) (1:1000) e anti- β actina (A2228, Sigma-Aldrich) (1:10,000). Os anticorpos secundários utilizados foram anti-rabbit e anti-mouse (GE Healthcare) (1:5000) conjugados com peroxidase. Como substrato para a reação quimioluminescente da peroxidase, foi utilizado o reagente SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Thermo Scientific). As bandas visualizadas foram quantificadas e normalizadas pela expressão da β -actina utilizando o software ImageJ (National Institute of Health – NIH).

4.14 Experimentos *in vivo*

Todos os experimentos *in vivo* foram feitos de acordo com e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas da UFRJ (CEUA-UFRJ) (no. L-016/2016). Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), obtidos do biotério central da UFRJ, foram atribuídos, no dia pós-natal 2 (P2) aos seguintes grupos (n=5/grupo): Mock (não infectado e não tratado), ZIKV, ZIKV+1; ZIKV+UMN-1001 e ZIKV+UMN-1002. Os ProTides UMN-1001, UMN-1002 e o composto parental 1 foram diluídos com solução salina (0,9% NaCl), a partir do estoque da droga sem exceder

1% de DMSO. Os animais dos grupos tratados receberam a primeira dose de cada composto a 25 mg/Kg/dia via intraperitoneal (i.p), enquanto os animais dos grupos Mock e ZIKV, foram desafiados com DMSO 1% em solução salina i.p um dia antes da infecção. Os animais foram tratados a cada 24h por 8 dias consecutivos.

No dia pós-natal 3 (P3), todos os animais, exceto os do grupo Mock, foram infectados com ZIKV-BR^{PE} via i.p diluído em 50 µL de DMEM, uma hora antes do tratamento com a segunda dose dos ProTides, os animais do grupo Mock receberam apenas 50 µL de DMEM via i.p. Todos os animais foram pesados diariamente e observados para a presença de sinais de doença e/ou mortalidade. Vinte e quatro horas após o último dia de tratamento (oitavo dia pós-infecção), os animais que sobreviveram foram anestesiados com isoflurano e perfundidos transcardialmente com solução salina gelada. Em seguida, o cérebro e os olhos foram coletados e rapidamente congelados por imersão em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a extração do RNA viral. Os tecidos foram homogeneizados em DMEM (0,2 mg de tecido:1 µL de DMEM) e submetidos à extração do RNA viral, síntese de cDNA e qPCR como descrito anteriormente no tópico 4.9.

Os resultados das amplificações foram analisados utilizando o sistema StepOne™ Real-Time PCR. Os valores de Ct foram utilizados para calcular o RNA equivalente ao PFU utilizando uma curva-padrão como descrita no tópico 4.9. As partículas virais infecciosas foram quantificadas pelo ensaio de formação de placa e os resultados foram normalizados por mg de tecido.

4.15 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o *software* GraphPad Prism versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992 – 2012. As diferenças entre três ou mais grupos foram analisadas por One-way ANOVA seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas e quando apenas dois grupos foram comparados, a análise foi feita pelo teste *t* de *Student* para amostras não pareadas ou pareadas quando preciso. As curvas dose-resposta utilizadas para calcular EC₅₀ e CC₅₀ foram geradas e analisadas no GraphPad Prism e as

equações com melhor *fit* dos dados foram geradas tendo como base valores e $R^2 \geq 0,9$. Os experimentos *in vivo* foram analisados por Two-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde os fatores determinados para a análise foram “tratamento” (UMN-1002 ou salina) e “tecido” (cerebral ou ocular). As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste Log rank utilizando o GraphPad Prism.

5 RESULTADOS

5.1. Avaliação da atividade antiviral dos ProTides inibidores da polimerase viral contra DENV e ZIKV

5.1.1 Determinação da citotoxicidade dos compostos

Inicialmente testamos a viabilidade das células Vero, HBMEC e SH-Sy5y frente ao tratamento com os ProTides UMN-1002, UMN-1002 e a pró-droga 2'C-β-Me-G parental **1** para avaliar a citotoxicidade e escolhermos a concentração de trabalho. Como ilustrado na **figura 11**, para esse ensaio utilizamos diferentes concentrações de cada composto variando entre 100 e 5 μM. A concentração de uso para cada uma delas foi determinada como a concentração máxima na qual se observou, no mínimo, 80% de viabilidade celular.

A citotoxicidade dos compostos testados variou em relação a linhagem celular, o que nos levou a utilizar diferentes concentrações do composto de acordo com o tipo celular. Em células Vero, não foi observada alteração na viabilidade celular nas concentrações testadas quando comparado com a situação controle de célula sem tratamento (**Figura 11A**). Desta forma, todos os pró-fármacos foram utilizados na concentração de 100 μM nessa linhagem celular. Já em células HBMEC, o tratamento com UMN-1002 na concentração de 100, 75 e 50 μM promoveu uma redução na viabilidade celular superior ao limite pré-estabelecido (46,95%; 66,92% e 72,95%, respectivamente), portanto a concentração de 25 μM foi utilizada para os experimentos realizados em HBMEC (**Figura 11B**). Nas células SH-Sy5y, o tratamento com UMN-1002 na concentração de 100 μM promoveu uma redução na viabilidade celular acima do limite estabelecido (64,89%), por tanto, a concentração de uso dessa droga nos experimentos em neuroblastoma foi de 50 μM (**Figura 11C**). O composto UMN-1001 não apresentou redução da viabilidade em HBMEC ou SH-Sy5y em nenhuma das concentrações testadas, sendo utilizado em 100 μM. O composto **1** não apresentou toxicidade independente da concentração ou linhagem celular.

Neste estudo também utilizamos as células Vero como modelo para investigar se a ativação intracelular dos compostos UMN-1001 e UMN-1002 é devida à atividade da enzima

celular de Hint1, por tanto, o perfil de toxicidade celular do inibidor farmacológico de Hint1, o TrpGc, foi avaliado nessas células. O tratamento com TrpGc não afetou a viabilidade das células Vero em nenhuma das concentrações testadas, por tanto os experimentos foram realizados com essa droga na concentração de 100 μM (Figura 11D).

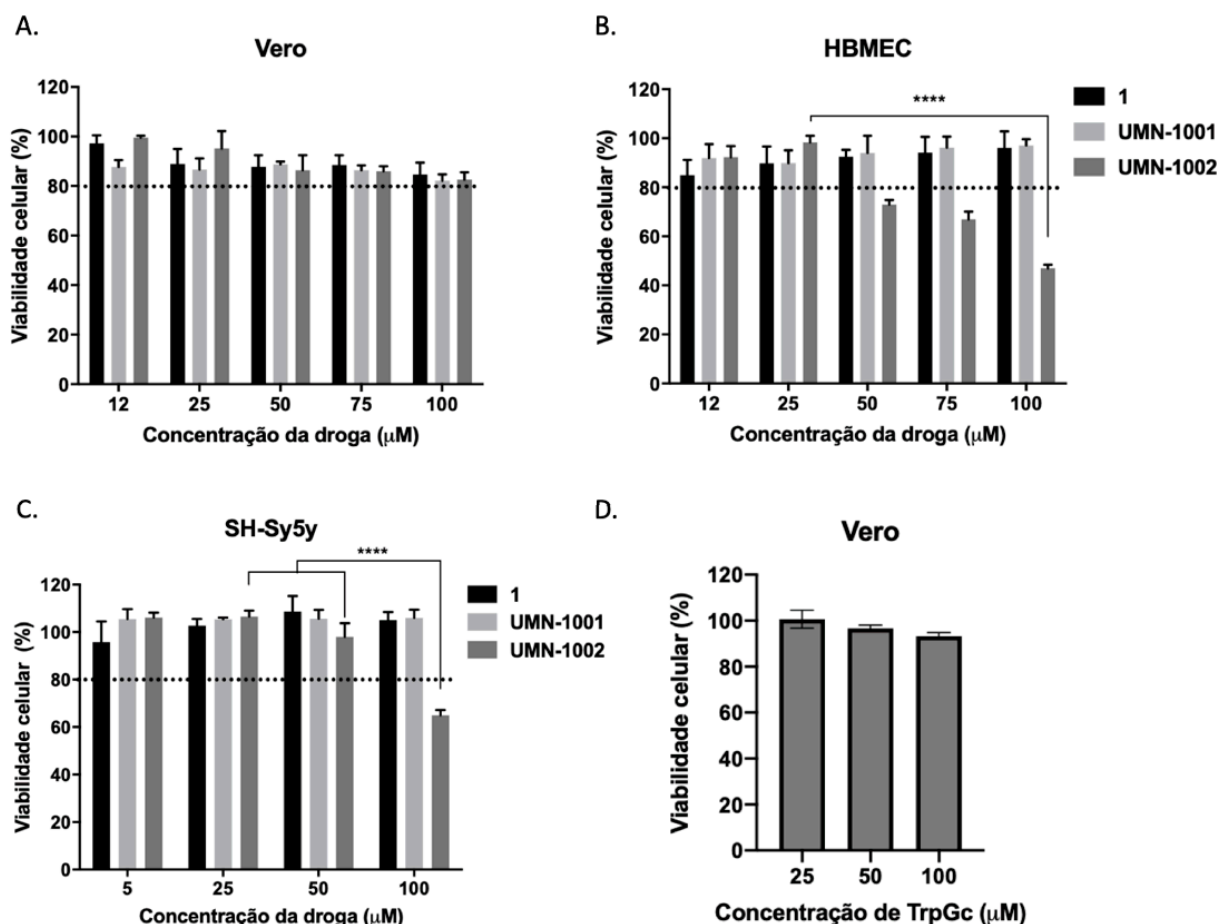


Figura 11 Ensaio de citotoxicidade dos pró-fármacos inibidores da polimerase viral e inibidor farmacológico de Hint1. Células Vero (A), HBMEC (B) e SH-Sy5y (C) foram incubadas com os ProTides UMN-1001, UMN-1002 e o análogo de nucleosídeo 2'C- β -Me-G (composto 1) em diferentes concentrações. (D). Células Vero foram incubadas o inibidor da proteína Hint1, TrpGc. A linha pontilhada representa o limite de citotoxicidade aceito para os ensaios (viabilidade superior a 80%). A concentração de uso foi determinada como a concentração máxima na qual houve preservação de 80% de viabilidade celular. As barras representam a média \pm D.P.M. A análise estatística dos resultados foi feita através de One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (**** $p < 0,0001$). N=3.

5.1.2 Inibição da replicação de DENV2 e o papel de Hint1 na ativação dos ProTides UMN-1001 e UMN-1002

Para avaliar a capacidade dos compostos estudados em reduzir a replicação do DENV-2, células Vero e HBMEC foram infectadas (MOI 0,2) e incubadas por 72 horas, pós-adsorção, com

os pró-fármacos nas concentrações máximas não tóxicas. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido para quantificação das partículas virais infecciosas liberadas, extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR para cálculo da porcentagem de inibição da replicação viral e quantificação do RNA equivalente ao PFU.

O tratamento com todos os compostos testados conseguiu reduzir significativamente a liberação de partículas infecciosas de DENV-2 em células Vero ($p > 0,01$ Tratamento vs. DENV-2), como mostra a **figura 12A**. Pode-se observar que na presença do inibidor farmacológico de Hint1, TrpGc, a atividade antiviral de UMN-1001 e UMN-1002 é revertida, o que não acontece para o composto 1, confirmando que esses ProTides precisam de Hint1 com sua atividade enzimática funcional para que sejam ativados. O composto 1, entretanto, não depende de Hint1 para sua ativação, por isso sua atividade é mantida ainda que Hint1 esteja inibida (**Figura 12A e B**). O tratamento com todos os compostos testados foi capaz de reduzir tanto a liberação de partículas virais infecciosas quanto a quantidade de RNA, como pode ser visto nas **figuras 12A e B**, na qual UMN-1001, UMN-1002 e 1 reduzem a quantidade de RNA de DENV equivalente ao PFU ($p > 0,0001$ DENV-2 vs. Tratamento).

Em HBMEC, o tratamento com todos os compostos testados foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de RNA viral (**Figura 12C**) ($p < 0,01$ UMN-1001 e 1 vs. DENV-2; $p < 0,001$ UMN-1002 vs. DENV-2) e a replicação de DENV-2 (**Figura 12D**) ($p < 0,0001$ Tratamento vs. DENV-2). Nós observamos que o UMN-1002 apresentou maior capacidade de redução do RNA viral quando comparado com os outros compostos testados ($***p < 0,001$ UMN-1002 vs. DENV-2; $**p < 0,01$ UMN-1001 e 1 vs. DENV-2) (**Figura 12C**). Na **tabela 6** estão demonstrados os valores de EC_{50} .

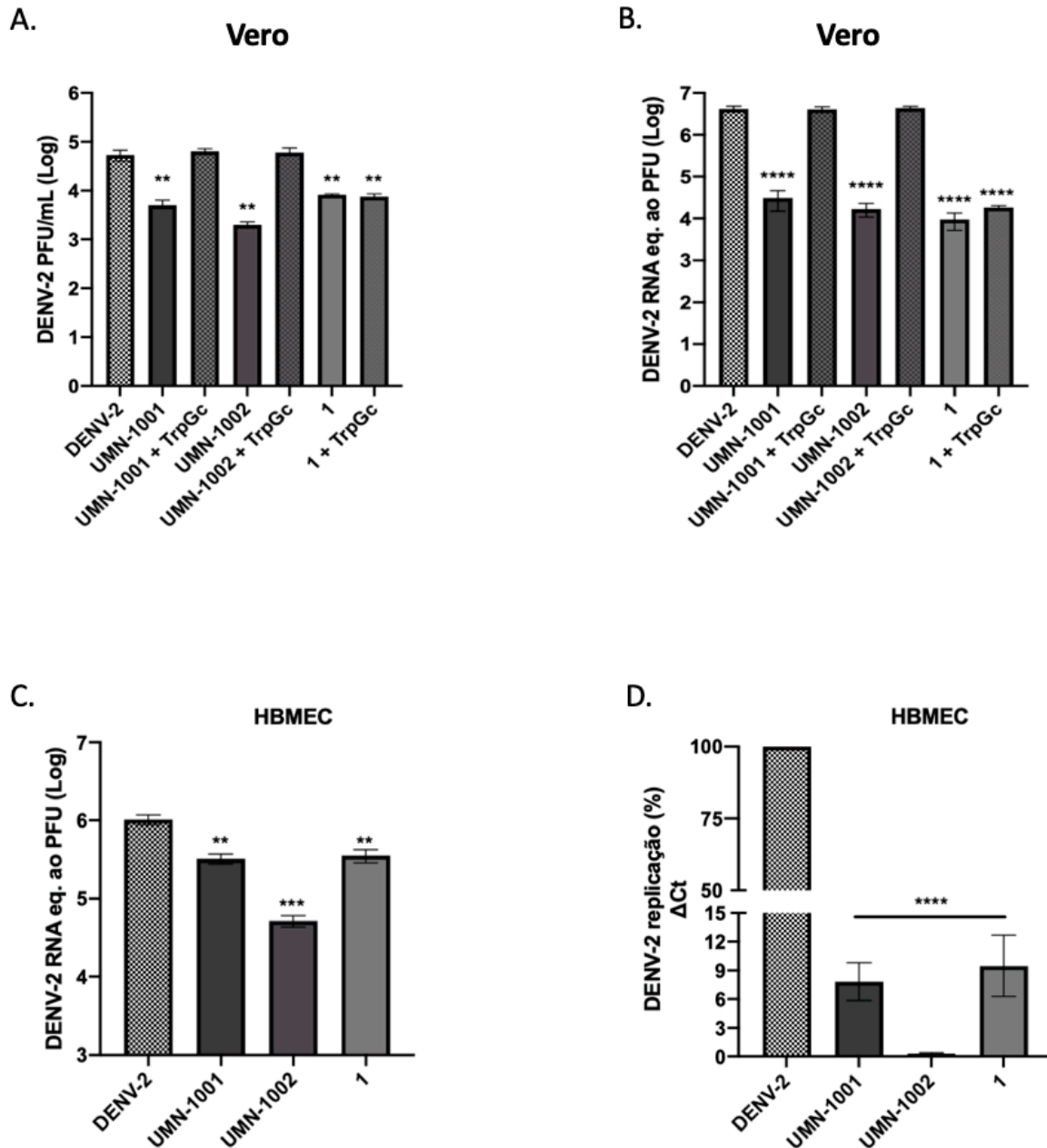


Figura 12 Atividade antiviral dos pró-fármacos inibidores da polimerase viral contra DENV-2 e o papel de Hint1 na ativação dos ProTides. As células foram infectadas com DENV-2 (MOI 0,2) e incubadas com os ProTides UMN-1001, UMN-1002 e com o análogo de nucleosídeo 2'-β-Me-G por 72 horas. (A) Quantificação das partículas infecciosas de DENV-2 no sobrenadante da cultura de Vero. (B) Quantificação do RNA equivalente ao PFU no sobrenadante da cultura de Vero por qPCR (C) Quantificação do RNA equivalente ao PFU no sobrenadante da cultura de HBMEC por qPCR (D) Percentual de replicação viral calculado por qPCR através do método do ΔCt. As barras representam a média das triplicatas ±D.P.M. A análise estatística dos resultados foi feita através de One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (**p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). Todas as comparações foram feitas em relação à condição sem tratamento. N=3.

Tabela 6 Parâmetros farmacológicos dos ProTides inibidores da polimerase viral contra DENV2 *in vitro*

Célula	HBMEC			Vero		
	1	UMN-1001	UMN-1002	1	UMN-1001	UMN-1002
Composto						
CMNT (μM)	100	100	25	100	100	100
CC ₅₀ (μM)	>200	>200	83.96	>200	>200	>200
DENV2 replicação (%) ^t	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,41	0,1 ± 0,05	6,53 ± 1,8	7,5 ± 3,7	1,28 ± 1,0
EC ₅₀ (μM) ^t	N.D	N.D	N.D	8,14 ±0,66	6,84 ±2,36	1,59 ±0,91
I.S	N.D	N.D	N.D	>30	>30	>150

Para o ensaio de replicação viral, células Vero foram infectadas com DENV2 (MOI 0,2) e tratadas com os compostos 1, UMN-1001 e UMN-1002 nas suas concentrações máximas não tóxicas (CMNT) por 72 hrs. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para extração do RNA viral e detecção do RNA genômico do DENV2 por qPCR. A percentagem de replicação viral foi calculada pelo método do ΔCt comparando as condições com e sem tratamento. A viabilidade celular foi avaliada através da incubação das células com cada um dos compostos com concentrações variando de 5 a 100 μM por 72 hrs para determinar a concentração máxima não tóxica e os valores da concentração citotóxica 50% (CC₅₀). O percentual de viabilidade celular foi determinado pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro. Os valores de CC₅₀ e EC₅₀ foram determinados por uma curva sigmoide dose-resposta onde foi plotado o percentual de viabilidade celular ou de replicação viral, respectivamente, pela concentração das drogas. (1) -2'-C- β -metilguanosina; (UMN-1001) - 2'-C- β -metilguanosinatriptaminafosforamidatomoéster; (UMN-1002) - 2-(metiltil)-etil-2'-C- β -metilguanosinatriptaminafosforamidatodiéster. IS - Índice de seletividade (CC₅₀/EC₅₀). ^tDados referentes à média \pm D.P.M com intervalo de confiança de 95%. N.D - Não determinado.

5.1.3 Inibição da replicação de ZIKV pelos ProTides inibidores da polimerase viral *in vitro*

Para avaliar a capacidade dos compostos estudados em reduzir a replicação do ZIKV, células Vero, HBMEC e SH-Sy5y foram infectadas (MOI 0,05, 0,5 e 1,0, respectivamente) e incubadas por 72 horas com os pró-fármacos nas concentrações máximas não tóxicas. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido para quantificação das partículas virais infecciosas liberadas, extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR para cálculo da percentagem de inibição da replicação viral e quantificação do RNA equivalente ao PFU.

Inicialmente, nós avaliamos a capacidade dos compostos testados em reduzir a replicação do ZIKV. Para isso, nós calculamos o percentual de replicação viral pelo método do ΔCt (**Figura 13 A-C**). O tratamento com todos os pró-fármacos foi capaz de reduzir significativamente o percentual e replicação de ZIKV em todas as células estudadas ($p < 0,0001$), sem diferença

significativa entre si, porém observamos uma tendência do UMN-1002 a apresentar maior capacidade de reduzir a replicação viral, principalmente em HBMEC.

Para continuar a investigação da capacidade dos compostos testados em reduzir a replicação viral, nós avaliamos o efeito do tratamento sobre a quantidade de RNA do ZIKV através da determinação da quantidade de RNA equivalente ao PFU. Todos os compostos testados foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de RNA do ZIKV em todas as células avaliadas (**Figura 13D**). Em células Vero, o tratamento com UMN-1002 apresentou resultado maior eficiência em relação aos demais compostos ($p < 0,001$ UMN-1002 vs. Não Tratado), enquanto UMN-1001 e 1 não reduziram significativamente a quantidade de RNA. Em HBMEC e SH-Sy5y, o tratamento com todos os compostos testados foi capaz de reduzir a quantidade de RNA viral, sem diferença significativa entre si, porém nas das duas linhagens celulares observamos uma tendência do ProTide UMN-1002 em demonstrar maior capacidade de redução do RNA viral quando comparado ao análogo de nucleosídeo parental 1.

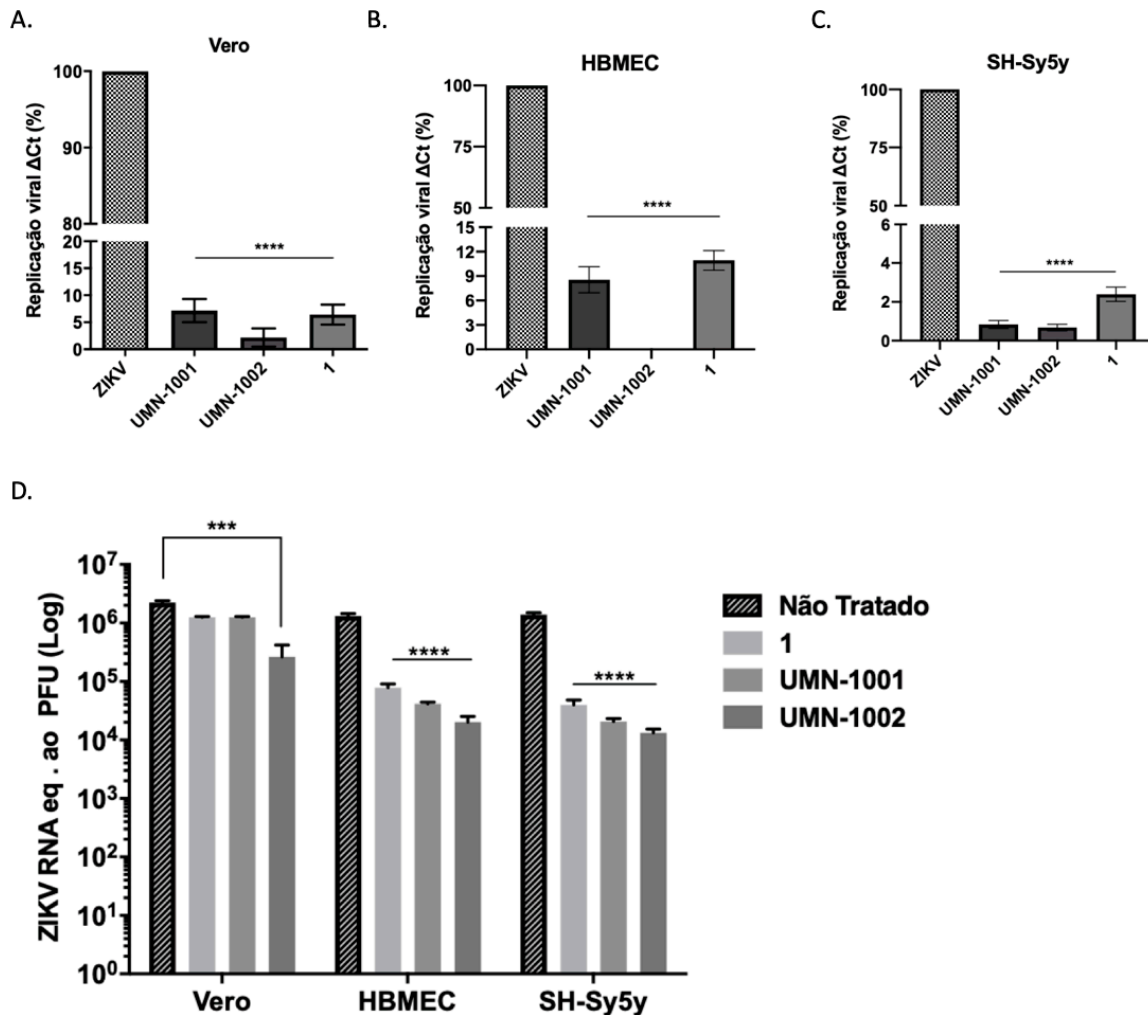


Figura 13 Atividade antiviral dos pró-fármacos inibidores da polimerase viral contra ZIKV. (A-C). As células Vero, HBMEC e SH-Sy5y foram infectadas com ZIKV-BR_{PE243} (MOI 0,05; 0,5 e 1, respectivamente) e incubadas com os ProTides UMN-1001, UMN-1002 e com o análogo de nucleosídeo 2'C-β-Me-G por 72 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para extração de RNA viral e determinação do percentual de replicação viral calculado por qPCR através do método do ΔCt. (D). Vero, HBMEC e SH-Sy5y foram infectadas com ZIKV-BR_{PE243} (MOI 0,05, 0,5, e 1,0, respectivamente) e tratadas com UMN-1001, UMN-1002 e 1 nas suas concentrações máximas não tóxicas. Células foram mantidas em cultura por 72 horas, então os sobrenadantes foram coletados para detecção do RNA de ZIKV por qPCR. As barras representam a Média ± D.P.M. A análise estatística dos resultados foi feita através de One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. (**p<0,001; ****p<0,0001). Todas as comparações foram feitas em relação à condição sem tratamento. N=3.

Para a determinação dos valores de EC₅₀ dos pró-fármacos testados, nós infectamos as células Vero, HBMEC e SH-Sy5y e tratamos com diferentes concentrações das drogas variando de 100 a 5 μM. Após 3 dias em cultura, nós avaliamos a redução da replicação de ZIKV em cada concentração de cada droga por qPCR utilizando o método do ΔCt e construímos uma curva dose-resposta. Para as células SH-Sy5y, o valor de EC₅₀ também foi determinado através da capacidade do tratamento em reduzir a quantidade de partícula viral infecciosa liberada frente ao tratamento em cada uma das concentrações. Os valores de EC₅₀ e os demais parâmetros farmacológicos

determinados para os compostos UMN-1001, UMN-1002 e 1 contra ZIKV estão resumidos na **tabela 7**, onde pode-se observar que o composto UMN-1002 apresentou maior capacidade de inibição da replicação viral, menores valores de EC_{50} e maiores valores de índice de seletividade, independente da linhagem celular, comparado ao análogo de nucleosídeo parental (1), confirmando o sucesso da estratégia de síntese desse composto.

Tabela 7 Parâmetros farmacológicos dos ProTides inibidores da polimerase viral contra ZIKV in vitro

Célula	HBMEC			SH-SY5Y			Vero		
	1	UMN-1001	UMN-1002	1	UMN-1001	UMN-1002	1	UMN-1001	UMN-1002
Composto	1	UMN-1001	UMN-1002	1	UMN-1001	UMN-1002	1	UMN-1001	UMN-1002
CMNT (μM)	100	100	25	100	100	50	100	100	100
CC ₅₀ (μM)	>200	>200	83.96	>200	>200	>200	>200	>200	>200
ZIKV replicação (%) ^t	11.16 ± 2.90	9.78 ± 2.56	0.64 ± 0.07	2.39 ± 0.63	0.83 ± 0.34	0.67 ± 0.29	6.42 ± 1.84	7.16 ± 3.70	2.17 ± 1.70
EC ₅₀ (μM) ^t	0.88 ± 0.05	0.43 ± 0.04	0.17 ± 0.06	2.09 ± 0.10	1.01 ± 0.09	0.43 ± 0.12	1.25 ± 0.19	1.07 ± 0.26	0.28 ± 0.07
I.S	>200	>465	>490	>95	>198	>465	>160	>186	>714

Para o ensaio de replicação de ZIKV, células foram infectadas com ZIKV-BR_{PE243} e tratadas com os compostos 1, UMN-1001 e UMN-1002 nas suas concentrações máximas não tóxicas (CMNT) por 72 hrs. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para extração do RNA viral e detecção do RNA genômico do ZIKV por qPCR. A porcentagem de replicação viral foi calculada pelo método do ΔCt comparando as condições com e sem tratamento. A viabilidade celular foi avaliada através da incubação das células com cada um dos compostos com concentrações variando de 5 a 100 μM por 72 hrs para determinar a concentração máxima não tóxica e os valores da concentração citotóxica 50% (CC₅₀). O percentual de viabilidade celular foi determinado pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro. Os valores de CC₅₀ e EC₅₀ foram determinados por uma curva sigmoide dose-resposta onde foi plotado o percentual de viabilidade celular ou de replicação viral, respectivamente, pela concentração das drogas. (1) -2'-C- β -metilguanosina; (UMN-1001) - 2'-C- β -metilguanosina triptaminafosforamidato monoéster; (UMN-1002) - 2-(metiltil)-etil-2'-C- β -metilguanosinatriptaminafosforamidatodiesté. IS - Índice de seletividade (CC₅₀/EC₅₀). ^tDados referentes à média \pm D.P.M com intervalo de confiança de 95%. N.D - Não determinado.

Para verificar se o tratamento impacta a replicação do genoma viral, nós infectamos HBMEC e SH-Sy5y com ZIKV (MOI 0,5 e 1,0, respectivamente) e tratamos com UMN-1001, UMN-1002 e 1, na sua concentração máxima não tóxica, por 18 horas e visualizamos o RNA de dupla fita (RNAdf), formado como um intermediário durante a etapa de replicação do genoma viral, por microscopia confocal. Para ambas as células, observamos que todos os compostos foram capazes de reduzir a formação do RNAdf com a mesma eficiência quando comparado com a condição sem tratamento. Entretanto, o tratamento com UMN-1002 pareceu ser mais eficiente quando comparado com 1 e UMN-1001, com menos RNAdf observável (**Figura 14**).

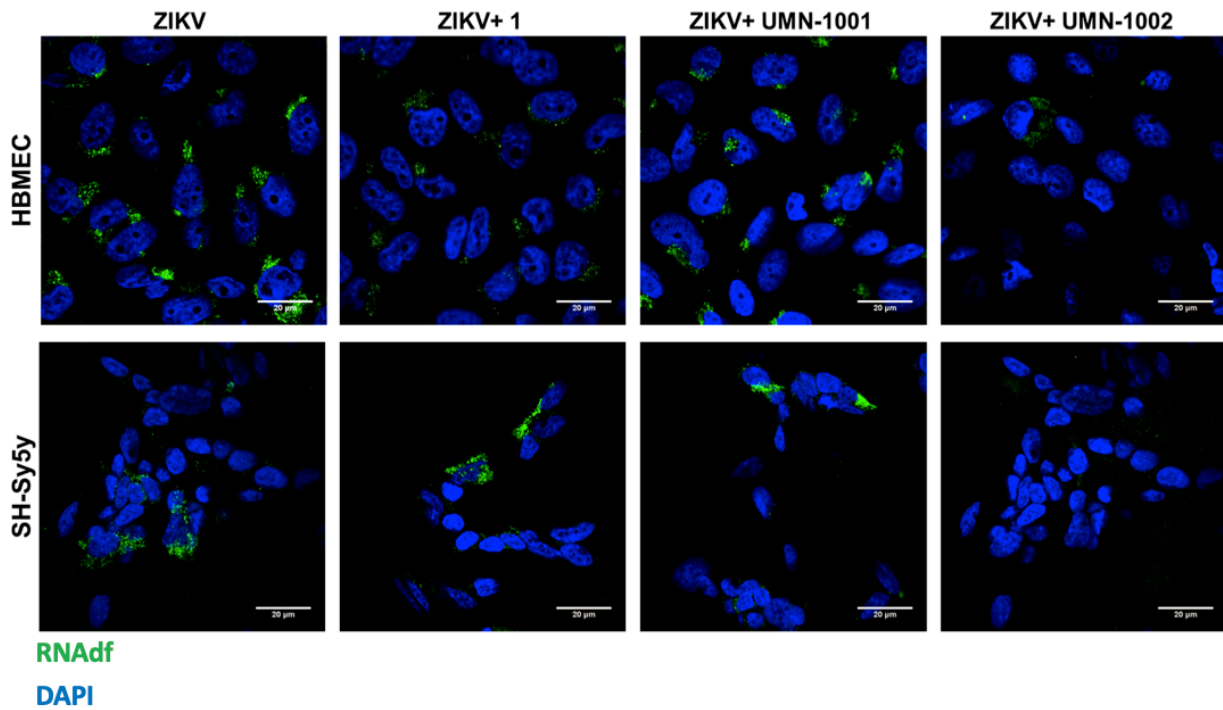


Figura 14 Atividade antiviral dos ProTides inibidores da polimerase e 2'-C-β-metilguanosina na replicação de genoma viral. Células HBMEC e SH-Sy5y foram infectadas com ZIKV-BR_{PE243} (MOI 0,5 e 1,0, respectivamente) e tratadas com UMN-1001, UMN-1002 e 1 nas suas concentrações máximas não tóxicas por 18 horas. O intermediário de replicação, RNAdf, foi detectado por microscopia confocal. Barra de tamanho 20 μM. Verde: RNAdf; Azul: DAPI.

5.1.4 Inibição da replicação de ZIKV pelos ProTides inibidores da polimerase viral *in vivo*

Após a caracterização da atividade antiviral dos compostos testados contra ZIKV *in vitro*, nós investigamos se os compostos testados poderiam inibir a infecção por ZIKV *in vivo*. Para isso, camundongos selvagens Swiss neonatos (n=5 por grupo) foram pré-tratados no dia pós-natal 2 (P2) (dia experimental 1) com os compostos 1, UMN-1001 e UMN-1002 a 25 mg/Kg/dia via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram infectados com 10⁵ PFU do ZIKV-BR_{PE243} no dia P3 (dia experimental) e a infecção foi seguida por tratamentos diários com os compostos até o sétimo dia pós-infecção. O experimento foi finalizado no dia P11, vinte e quatro horas após o último tratamento, com coleta dos tecidos cerebrais e oculares (**Figura 15A**). Os animais dos grupos Mock (não tratado e não infectado) e ZIKV (infectado e não tratado) foram inoculados com DMSO 1% em solução salina diariamente após a infecção viral.

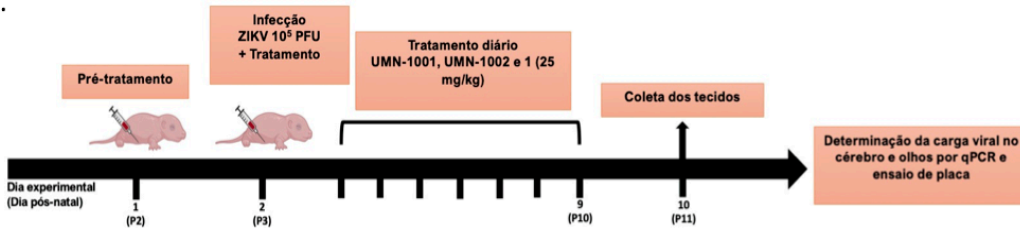
Os animais foram pesados diariamente e uma curva de peso foi construída (**Figura 15B**). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Mock, UMN-1002 e ZIKV. A partir dos dados dos pesos, nós analisamos a área sob a curva de cada grupo e normalizamos pelo Mock, e podemos observar que embora não tenhamos visto diferença significativa na variação bruta do peso entre os grupos, os animais tratados com UMN-1002 apresentaram maior tendência ao ganho de peso quando comparado com os outros grupos tratados (**Figura 15C**). Os tratamentos com os compostos 1 e UMN-1001 apresentaram toxicidade na dose testada e todos os animais desses grupos morreram nos dias experimentais 5 e 6, respectivamente. Um dos animais do grupo ZIKV morreu com 5 dias pós-infecção, entretanto todos os animais tratados com UMN-1002 sobreviveram (**Figura 15D**).

Para avaliar o efeito do UMN-1002 na carga viral no tecido cerebral e ocular, a quantidade de RNA genômico do ZIKV equivalente ao PFU, assim como as partículas virais infecciosas nesses tecidos, foram quantificados por qPCR e ensaio de formação de placa, respectivamente. O tratamento com UMN-1002 demonstrou ser capaz de reduzir aproximadamente meio log o número de RNA equivalente ao PFU no cérebro e cerca de 2 logs nos olhos (**Figura 15E**). Além disso, o

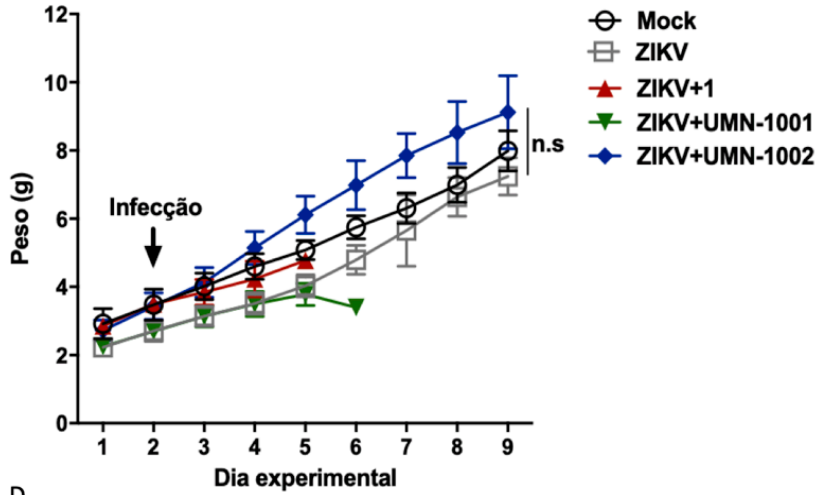
tratamento com UMN-1002 reduziu aproximadamente 1,5 log e 1,0 log a quantidade de partículas infecciosas do ZIKV nos tecidos cerebral e ocular, respectivamente (**Figura 15F**).

Com base nesses resultados, vemos que o tratamento com UMN-1001, UMN-1002 e 1 é capaz de reduzir a replicação de ZIKV e DENV em diferentes linhagens celulares. E que UMN-1002 possui atividade superior ao UMN-1001 e ao análogo de nucleosídeo parental 1. Interessantemente, UMN-1002 apresentou maior toxicidade *in vitro* quando comparado aos demais compostos, porém não apresentou toxicidade *in vivo* na dose estudada ao contrário de 1 e UMN-1001 em que todos os animais tratados com esses compostos na dose estudada morreram.

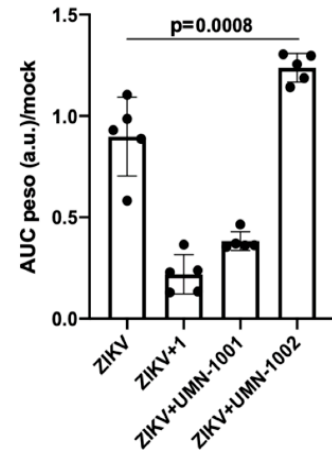
A.



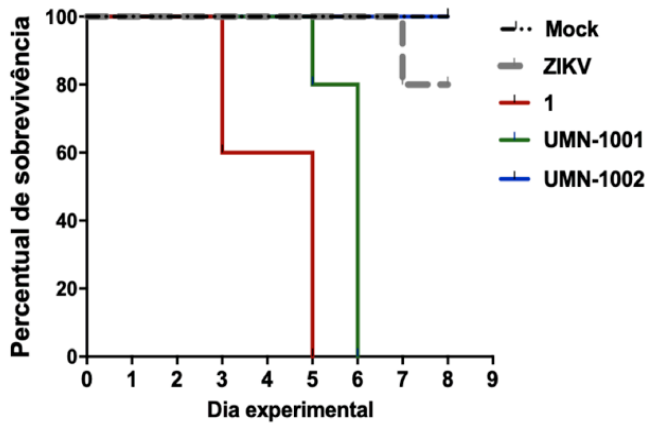
B.



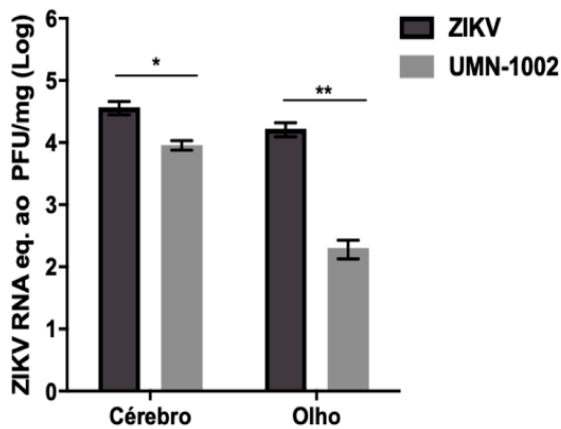
C.



D.



E.



F.

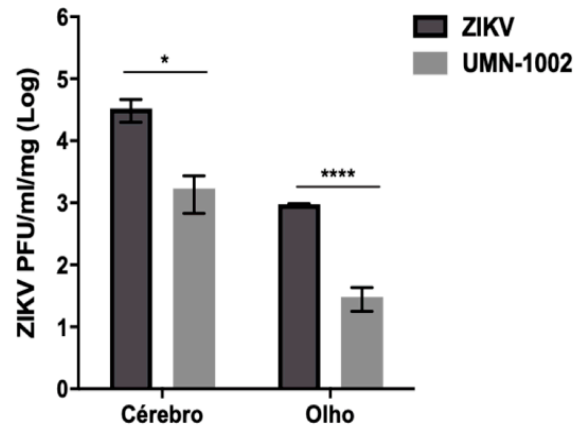


Figura 15 Avaliação da atividade in vivo dos ProTides inibidores da polimerase e 2'-C-β-metilguanosina. (A). O desenho experimental consistiu em injeção intraperitoneal (i.p.) dos compostos 1, UMN-1001 e UMN-1002 (25 mg/Kg/dia), e 1% DMSO diluído em solução salina i.p. para os grupos Mock e ZIKV no dia P2 (n=5 por grupo), seguido de infecção com ZIKV-BR_{PE243} (10⁵ PFU) i.p. ou DMEM para o grupo Mock no dia P3. O tratamento com os compostos testados foi seguido diariamente até o dia P9. Os tecidos foram coletados no dia P10. (B). Cinética do ganho ou perda de peso durante os dias do tratamento. (C). Gráfico de barras mostrando os valores da área sob a curva gerado a partir das curvas de peso e normalizados pelos valores da variação de peso do grupo Mock. p=0,0008 por one-way ANOVA seguido de teste de Tukey. (D). Curvas de sobrevivência. (E, F). Cérebro e olhos dos animais tratados com UMN-1002 foram homogeneizados seguido de extração de RNA para detecção do RNA genômico viral por qPCR e titulação viral por ensaio de formação de placa. (E). Gráfico de barras mostrando os valores de RNA viral equivalente ao PFU no cérebro e nos olhos. (F). Gráfico de barras mostrando os valores de partícula viral infecciosa no cérebro e olhos. Dados foram normalizados por miligrama de tecido. As barras indicam a média± D.P.M. *p<0,05; **p<0,01 por two-way ANOVA seguido de teste de Tukey.

5.2. Atividade antiviral dos ProTides inibidores da iniciação da tradução via cap-dependente contra ZIKV e SARS-CoV-2

5.2.1. Determinação da citotoxicidade de 4Ei-10 e 4Ei-11

Os compostos 4Ei-10 e 4Ei-11 são pró-nucleotídeos desenvolvidos para fazer a entrega intracelular de um antagonista seletivo do fator de iniciação de tradução de eucariotos eIF4E. O tratamento com esses compostos tem como alvo a inibição da via de síntese proteica dependente de cap. Como o SARS-CoV-2 e o ZIKV possuem genoma de RNA positivo e capeado, entende-se que eles utilizem dessa via para síntese das suas proteínas, sendo por tanto um alvo interessante com potencial antiviral a ser estudado.

Inicialmente nós avaliamos o perfil de toxicidade celular dos compostos 4Ei-10 e 4Ei-11 nos modelos celulares escolhidos para os testes de atividade contra o ZIKV e SARS-CoV-2 (**Figura 16**). Os testes com ZIKV foram realizados em células HEK 293 e SH-Sy5y e somente com o composto 4Ei-11. Para isso, as células foram tratadas com 4Ei-11 em concentrações que variaram de 100 a 1,56 μM por 72 horas e a viabilidade celular foi avaliada utilizando um ensaio de metabolização de MTS. O tratamento com 4Ei-11 não alterou a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 16A**), enquanto para as células SH-Sy5y, o mesmo composto na concentração de 100 e 50 μM, reduziu mais de 20% a viabilidade (**Figura 16B**) e por isso, os

experimentos feitos em SH-Sy5y foram realizados com 4Ei-11 em concentrações menores ou iguais a 25 μM .

A linha de células Calu-3 foi utilizada como modelo celular para avaliar o efeito do tratamento com 4Ei-10 e 4Ei-11 na infecção por SARS-CoV-2. Inicialmente, avaliamos o perfil de toxicidade desses compostos nessa linha celular. As células foram tratadas com cada um dos ProTides em concentrações que variaram de 3 a 0,093 μM , e avaliadas 24 ou 48 horas após o tratamento. Para essas células, o limite mínimo de viabilidade celular estabelecido para seleção da dose foi de 75% e o tratamento com ambos os compostos manteve a viabilidade acima desse valor independente da concentração testada e do tempo avaliado (**Figura 16C e D**).

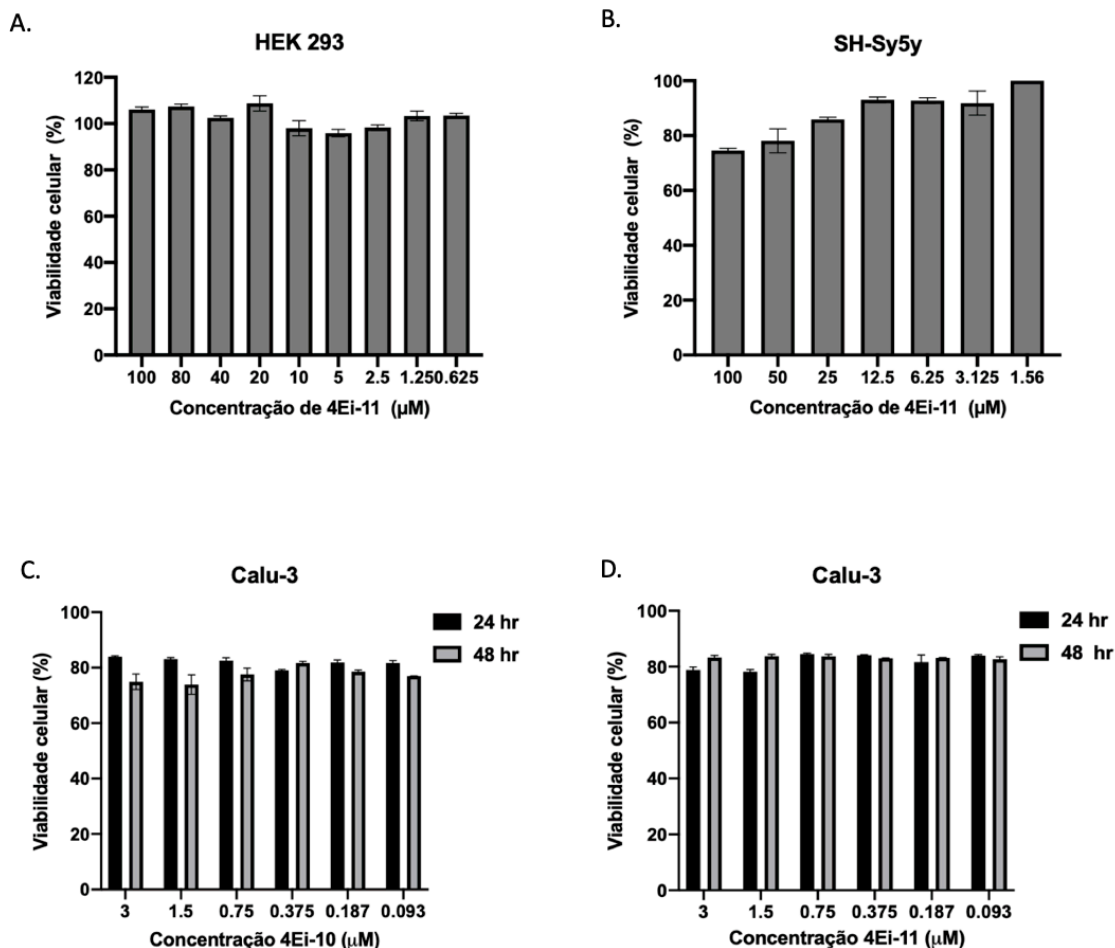


Figura 16 Perfil de toxicidade celular dos ProTides 4Ei-10 e 4Ei-11. (A) Células HEK 293 foram tratadas com 4Ei-11 em concentrações variando de 6,25 a 100 μM por 72 horas. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTS. (B) Células SH-Sy5y foram tratadas com 4Ei-11 em concentrações variando de 1,56 a 100 μM por 72 horas. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTS. (C, D) Células Calu-3 foram tratadas com 4Ei-10 e 4Ei-11, por 24 e 48 horas, em concentrações variando entre 3 μM e 0,093 μM Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTS. Barras representam médias \pm D.P.M. de três experimentos independentes.

5.2.2. Atividade antiviral do ProTide 4Ei-11 contra ZIKV

Como mencionado anteriormente, a atividade antiviral do ProTide 4Ei-11 contra ZIKV foi avaliada em células HEK 293 e SH-Sy5y. Primeiramente, nós investigamos se o tratamento com o composto testado seria capaz de reverter ou reduzir a mortalidade celular causada pela infecção por ZIKV. As células HEK 293 e SH-Sy5y foram pré-tratadas com a droga, nas concentrações mostradas na **figura 17**, 4 horas antes da infecção. Em seguida, as células foram infectadas com ZIKV-BR_{PE243} (MOI 0,1 e 1,0, respectivamente), na presença da droga. Após o tempo de adsorção (1 hora), o inóculo viral foi removido e foi adicionado meio de cultura com o composto diluído nas concentrações determinadas. As células foram mantidas em cultura por 72 horas e em seguida a viabilidade celular foi determinada. Na infecção de células SH-Sy5y, além da avaliação da viabilidade celular, nós quantificamos as partículas virais liberadas por ensaio de formação de placa.

O tratamento com 4Ei-11 foi capaz de prevenir significativamente a redução da viabilidade celular causado pela infecção nas células HEK 293 em diferentes concentrações. Esse efeito foi mais significativamente observado nas concentrações 6,25 e 1,56 μM (**Figura 17A**). Em células SH-Sy5y, o tratamento com 4Ei-11 preveniu significativamente a redução da viabilidade celular promovida pela infecção pelo ZIKV (**Figura 17B**). O tratamento com 4Ei-11 em SH-Sy5y, além de proteger as células da redução da viabilidade promovida pelo ZIKV, também reduziu significativamente a liberação de partículas virais infecciosas em todas as concentrações testadas de 25 a 0,19 μM (**Figura 17C**).

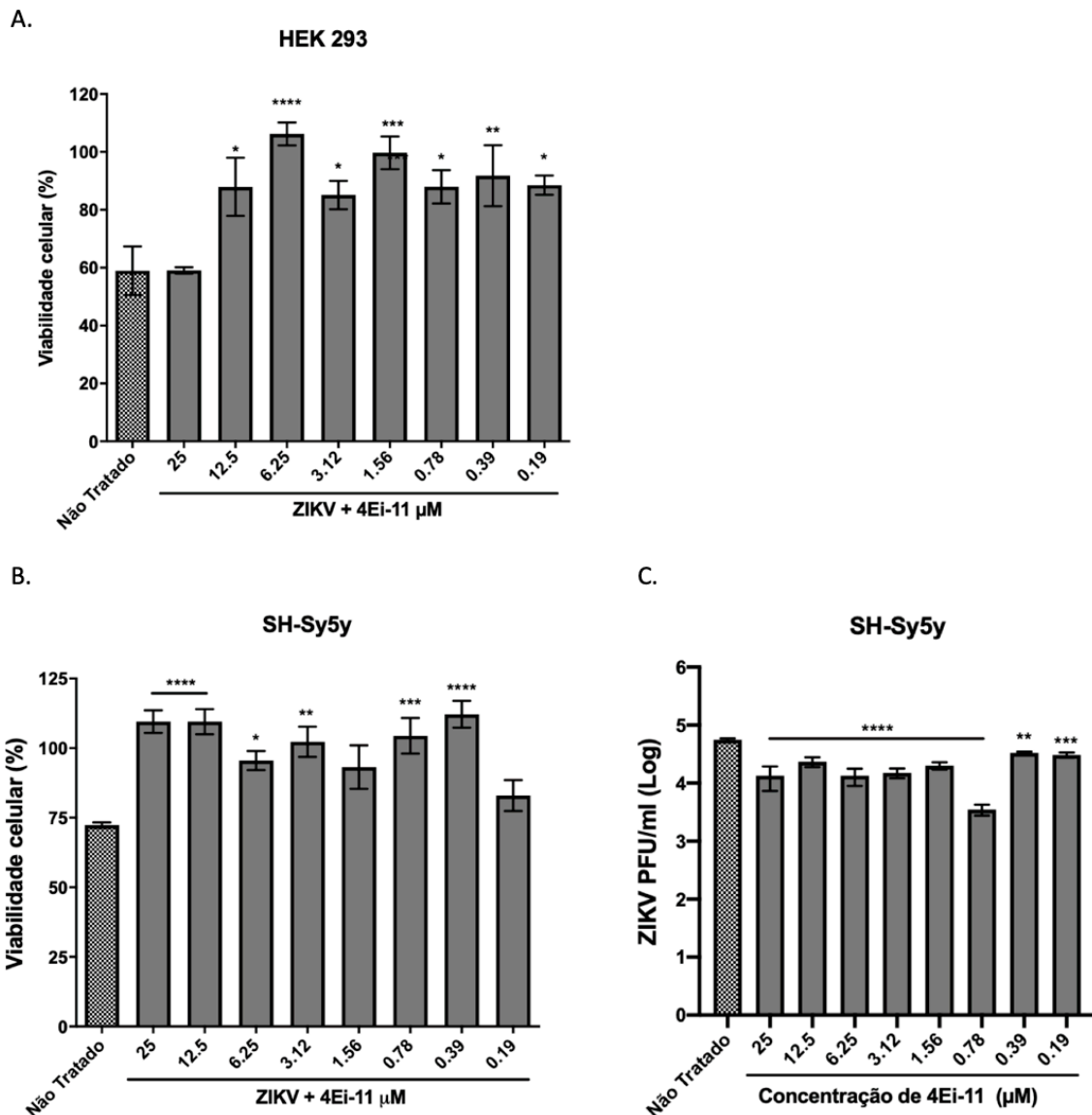


Figure 17 Atividade antiviral do ProTide 4Ei-11 contra ZIKV em células HEK 293 e SH-Sy5y. (A). Células HEK 293 foram pré-tratadas com 4Ei-11 em concentrações variando de 6,25 a 100 µM. Em seguida, foram infectadas com ZIKV-BR_{PE243} (MOI 0,1) com reposição da droga e mantidas em cultura por 72 horas. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTS. (B). Células SH-Sy5y pré-tratadas com 4Ei-11 em concentrações variando de 0,19 a 25 µM. Em seguida, foram infectadas com ZIKV-BR_{PE243} (MOI 1,0) com reposição da droga e mantidas em cultura por 72 horas. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTS e as partículas virais infecciosas foram quantificadas por ensaio de formação de placa. As barras indicam a média± D.P.M. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 por One-way ANOVA seguido de teste de Tukey. N=3. Todas as comparações foram feitas em relação à condição sem tratamento.

5.2.3. Atividade antiviral dos ProTides 4E-10 e 4Ei-11 contra SARS-CoV-2

A atividade antiviral contra SARS-CoV-2 dos compostos ProTides 4Ei-10 e 4Ei-11 foi avaliada em células Calu-3, células endoteliais de pulmão humanos, por tanto um modelo mais próximo da patogênese da COVID-19. Da mesma forma que na infecção pelo ZIKV, as células foram pré-tratadas por 4 hrs antes da infecção com cada um dos compostos em concentrações que

variaram de 3 a 0,093 μM . A infecção foi feita com um isolado do SARS-CoV-2 da linhagem B.1.1.33, referido aqui como 545, em MOI 0,1. As drogas foram mantidas durante o período de adsorção do vírus (1hr). Em seguida, o inóculo viral foi removido e as drogas foram adicionadas novamente. Nos devidos tempos pós-infecção os sobrenadantes foram coletados para quantificação das partículas virais liberadas por ensaio de formação de placa e as células foram fixadas para análise do RNAdf intermediário da replicação e da proteína viral Spike por imunofluorescência. Após a marcação, as células foram visualizadas e analisadas por microscopia confocal com automatização para triagem de alto conteúdo (HCS, do inglês *High content screening*).

O tratamento com ambos os ProTides foi capaz de reduzir significativamente a quantidade da proteína Spike, do RNAdf intermediário da replicação viral e a progênie viral infecciosa nos tempos de 24 e 48 hpi (**Figuras 18 e 19**). O tratamento com 4Ei-10 reduziu significativamente a quantidade de células marcadas para a presença do RNAdf em 24 hpi nas concentrações 0,38 e 0,19 μM ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 18A**). Já em 48 hpi, a redução do RNAdf observada foi significativa para todas as concentrações testadas ($p < 0,0001$) (**Figura 18D**). Com relação à redução da marcação da proteína viral Spike, o tratamento com 4Ei-10 foi eficaz em todas as concentrações testadas tanto em 24 quanto em 48 hpi ($p < 0,0001$) (**Figuras 18B e E**). A redução significativa da quantidade de partículas virais infecciosas liberadas em 24 hpi foi observada com o tratamento com 4Ei-10 3, 1,5, 0,75 e 0,09 μM ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 18C**). Em 48 hpi, o tratamento com 4Ei-10 em todas as concentrações testadas inibiu totalmente a quantidade de partículas virais infecciosas liberadas (**Figura 18F**).

O tratamento com 4Ei-11 reduziu significativamente a quantidade do RNAdf em 24 hpi nas concentrações 3 e 0,19 μM ($p < 0,001$) e com eficácia similar de 1,5 a 0,38 μM ($p < 0,0001$) (**Figura 19A**). Em 48 hpi, o ProTide 4Ei-11 reduziu significativamente a presença do RNAdf em todas as concentrações testadas ($p < 0,0001$) (**Figura 19D**). Quanto à redução da quantidade de células positivas para a presença da proteína viral Spike, o tratamento com 4Ei-11 foi igualmente eficaz em todas as concentrações testadas ($p < 0,0001$), independente do tempo avaliado (**Figuras**

19B e E). Além da redução da proteína Spike e do RNAdf, o tratamento com 4Ei-11 também reduziu significativamente a quantidade de partículas virais infecciosas liberadas em 24 hpi nas concentrações de 1,5 e 0,75 μM ($p < 0,05$), e 0,19 e 0,09 μM ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente) (**Figura 19C**). O tratamento com 4Ei-11 inibiu totalmente a quantidade de partículas virais infecciosas liberadas em 48 hpi nas concentrações de 3 a 0,38 μM e, ainda que tenhamos observado partículas virais infecciosas liberadas com o tratamento com 4Ei-11 nas concentrações de 0,19 e 0,09 μM , a redução em relação ao controle não tratado foi significativa ($p < 0,0001$) (**Figura 19F**).

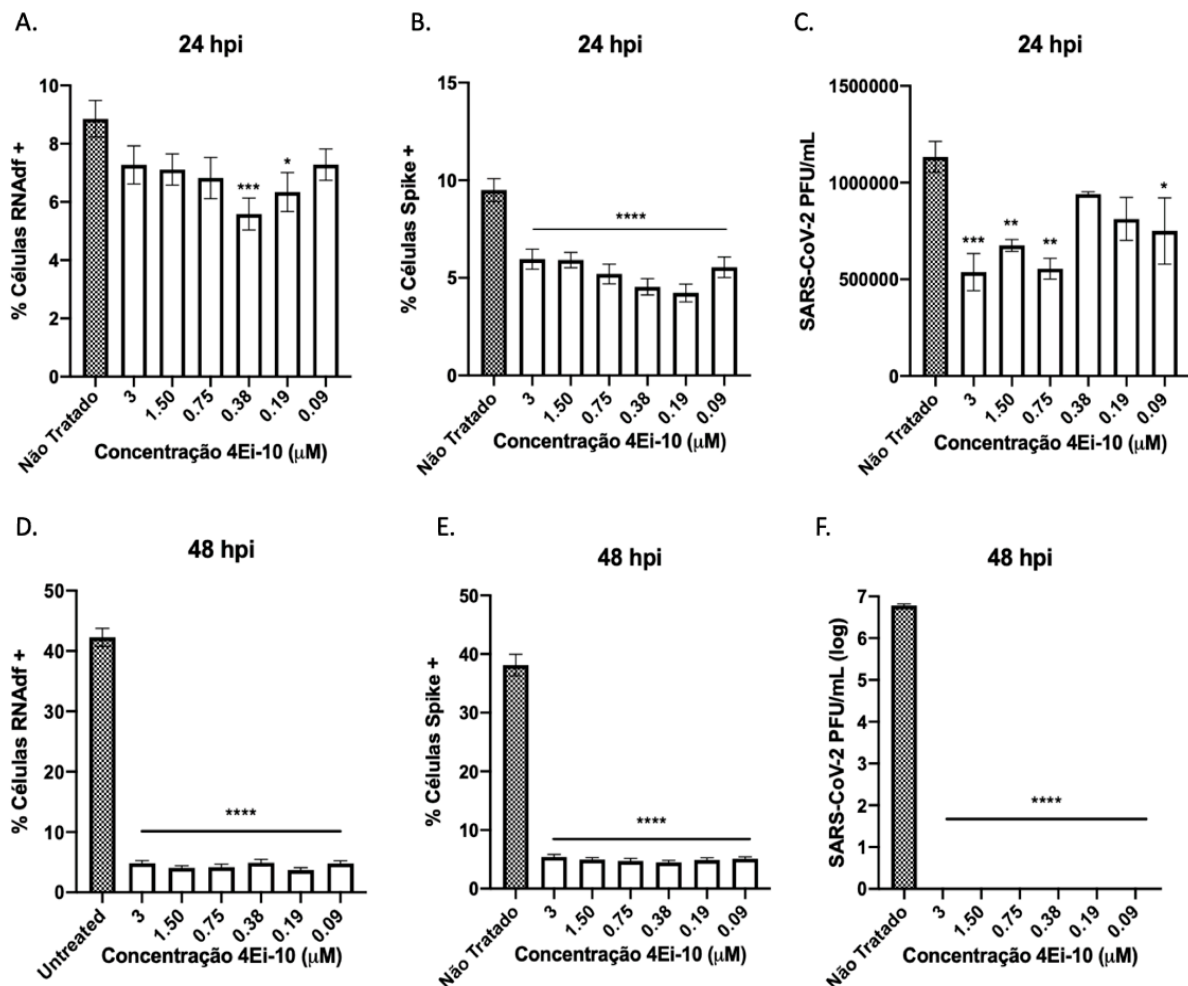


Figure 18 Atividade do Protide 4Ei-10 contra SARS-CoV-2 em células Calu-3. As células foram pré-tratadas com 4Ei-10 em concentrações variando de 3 a 0,09 μM por 4 horas antes da infecção. Em seguida, as células foram infectadas com o isolado SARS-CoV-2 545 (linhagem B.1.1.33) MOI 0,1, na presença da droga. Após 1hr de adsorção viral, o inóculo viral foi removido e a droga foi readicionada. As células foram incubadas por até 48 hrs. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados para ensaio de formação de placa para quantificação da quantidade de partículas virais infecciosas liberadas (C e F). Após a coleta dos sobrenadantes, as células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com anticorpos específicos para a proteína viral Spike e para o RNAdf. Anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor 488 (FITC) e Alexa Fluor 594 (Texas Red) foram utilizados para a visualização da presença da spike e do RNAdf, respectivamente. As células foram observadas por microscopia confocal, utilizando um microscópio ImageXpress Ultra

com automatização para triagem de alto conteúdo através do *software* MetaXpress versão 4.0.0.42. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por two-way ANOVA seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas. Barras representam média \pm D.P.M. Todas as comparações foram feitas em relação à condição sem tratamento. N=3.

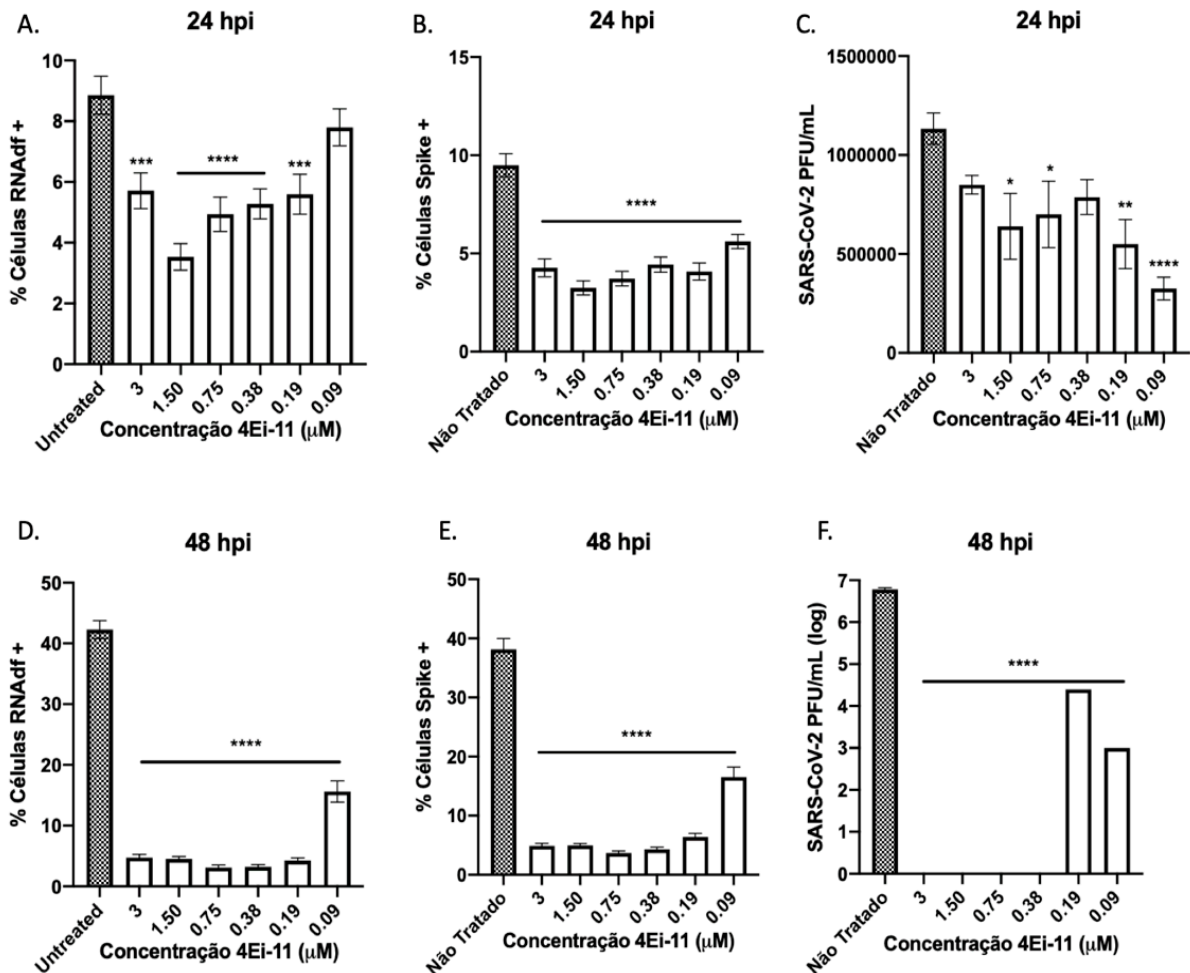


Figura 19 Atividade do Protide 4Ei-11 contra SARS-CoV-2 em células Calu-3. As células foram pré-tratadas com 4Ei-11 em concentrações variando de 3 a 0,09 μ M por 4 horas antes da infecção. Em seguida, as células foram infectadas com o isolado SARS-CoV-2 545 (linhagem B.1.1.33) MOI 0,1, na presença da droga. Após 1hr de adsorção viral, o inóculo viral foi removido e a droga foi readicionada. As células foram incubadas por até 48 hrs. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados para ensaio de formação de placa para quantificação da quantidade de partículas virais infecciosas liberadas (C e F). Após a coleta dos sobrenadantes, as células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com anticorpos específicos para a proteína viral Spike e para o RNA_{df}. Anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor 488 (FITC) e Alexa Fluor 594 (Texas Red) foram utilizados para a visualização da presença da spike e do RNA_{df}, respectivamente. As células foram observadas por microscopia confocal, utilizando um microscópio ImageXpress Ultra com automatização para triagem de alto conteúdo através do *software* MetaXpress versão 4.0.0.42. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por two-way ANOVA seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas. Barras representam média \pm D.P.M. Todas as comparações foram feitas em relação à condição sem tratamento. N=3.

Imagens representativas da microscopia confocal para o as condições sem tratamento e com tratamento na concentração de 0,38 μ M nos tempos de 24 e 48 horas pós-infecção foram selecionadas e estão representadas nas **figuras 20 e 21**, para 4Ei-10 e 4Ei-11, respectivamente.

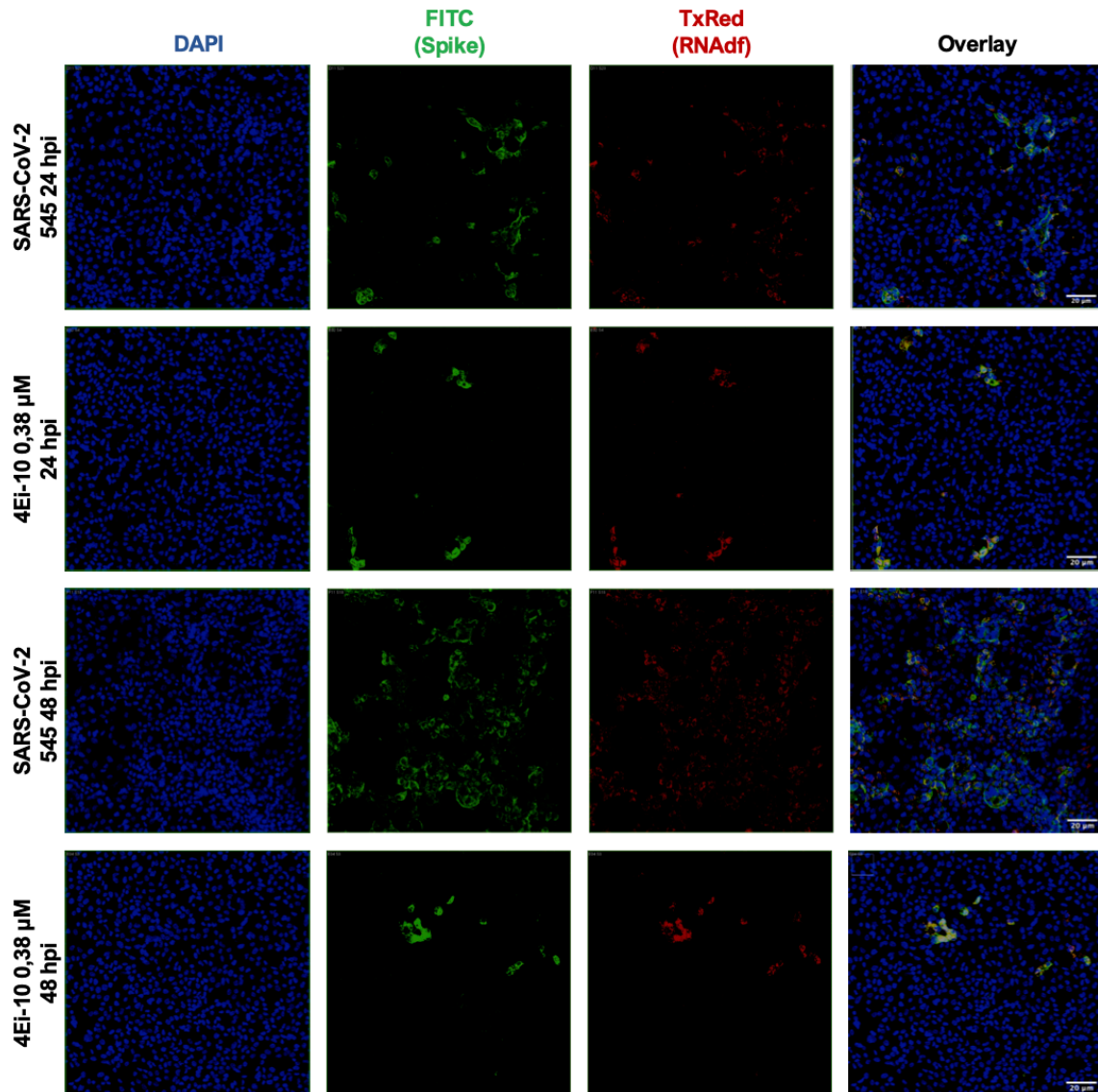


Figura 20 Microscopia confocal para visualização da proteína spike do SARS-CoV-2 e do RNAdf em células Calu-3 tratadas com 4Ei-10. As células foram pré-tratadas com 4Ei-10 0,38 μ M por 4 horas antes da infecção. Em seguida, as células foram infectadas com o isolado SARS-CoV-2 545 (linhagem B.1.1.33) MOI 0,1, na presença da droga. Após 1hr de adsorção viral, o inóculo viral foi removido e a droga foi readicionada. As células foram incubadas por até 48 hrs. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e as células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com anticorpos específicos para a proteína viral Spike e para o RNAdf. Anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor 488 (filtro FITC) e Alexa Fluor 594 (filtro Texas Red) foram utilizados para a visualização da presença da spike e do RNAdf, respectivamente. As células foram observadas por microscopia confocal, utilizando um microscópio ImageXpress Ultra com automatização para triagem de alto conteúdo através do *software* MetaXpress versão 4.0.0.42.

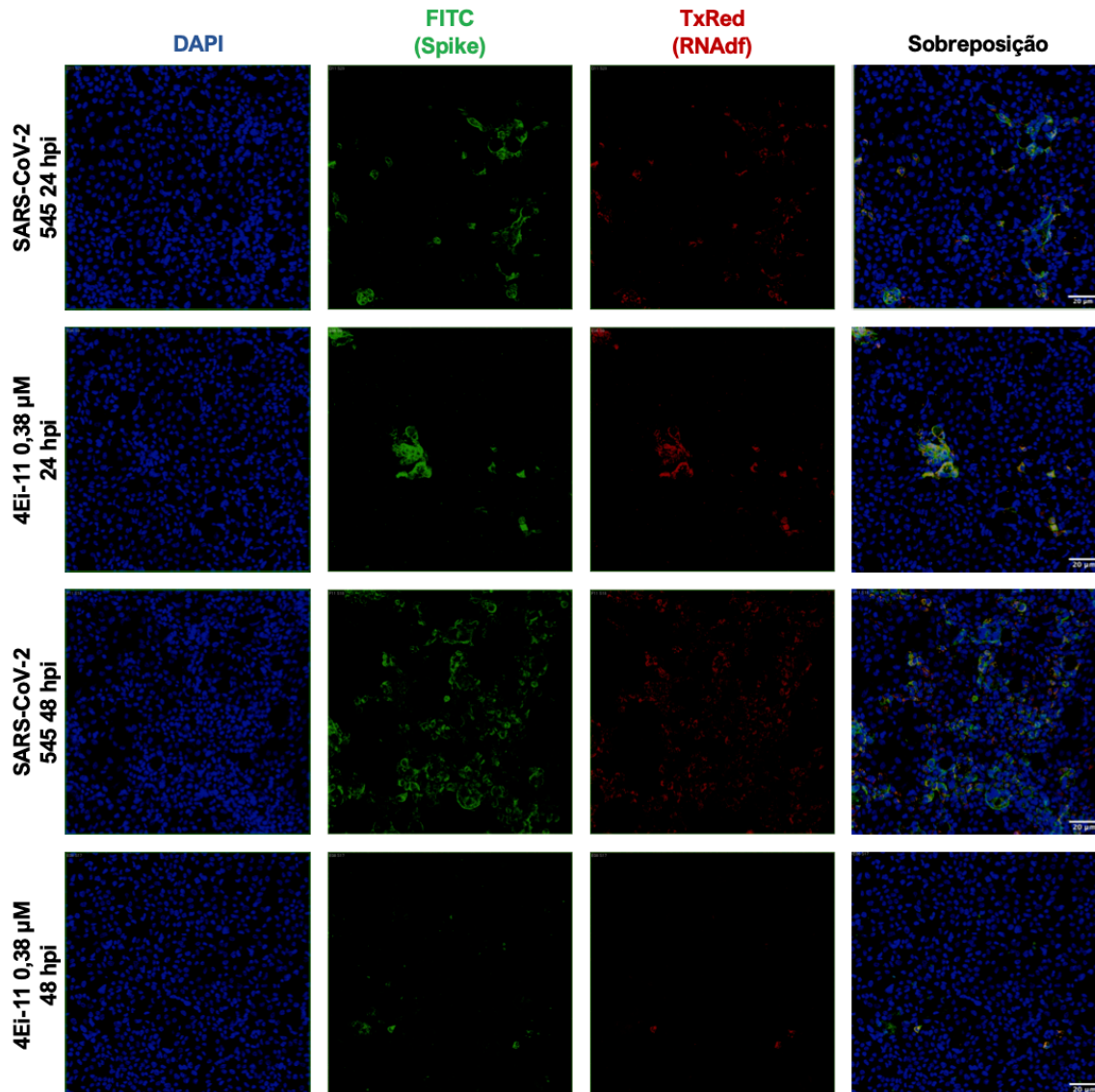


Figura 21 Microscopia confocal para visualização da proteína spike do SARS-CoV-2 e do RNAdf em células Calu-3 tratadas com 4Ei-11. As células foram pré-tratadas com 4Ei-11 0,38 μ M por 4 horas antes da infecção. Em seguida, as células foram infectadas com o isolado SARS-CoV-2 545 (linhagem B.1.1.33) MOI 0,1, na presença da droga. Após 1hr de adsorção viral, o inóculo viral foi removido e a droga foi readicionada. As células foram incubadas por até 48 hrs. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e as células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com anticorpos específicos para a proteína viral Spike e para o RNAdf. Anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor 488 (filtro FITC) e Alexa Fluor 594 (filtro Texas Red) foram utilizados para a visualização da presença da spike e do RNAdf, respectivamente. As células foram observadas por microscopia confocal, utilizando um microscópio ImageXpress Ultra com automatização para triagem de alto conteúdo através do *software* MetaXpress versão 4.0.0.42.

5.3 Atividade anti-SARS-CoV-2 do Efavirenz

Dados não publicados do nosso grupo apontam para o papel antiviral do EFV na infecção pelo vírus Chikungunya *in vitro* e *in vivo* através da modulação de estresse oxidativo e autofagia. Diferentes trabalhos apontam para o papel do EFV no tratamento de diferentes tipos de câncer devido sua capacidade de modular a resposta ao estresse oxidativo. Como a infecção pelo SARS-

CoV-2 está associada à indução de estresse oxidativo e modulação da autofagia, investigamos a possível atividade antiviral do EFV na infecção por SARS-CoV-2.

A atividade anti-SARS-CoV-2 do Efavirenz (EFV) foi avaliada nos seguintes modelos celulares: Vero E6, Huh-7, Calu-3, THP-1 e monócitos humanos primários. Os experimentos em Calu-3 e Vero E6 foram realizados com três diferentes isolados virais: SARS-CoV-2 545 (linhagem: B.1.1.33), SARS-CoV-2 814 (linhagem P2) e SARS-CoV-2 RJ1 (linhagem A2). Nas demais células, as infecções foram feitas com SARS-CoV-2 RJ1.

Para a determinação do perfil citotóxico do EFV, as células foram incubadas com o fármaco em diferentes concentrações por até 48, para Vero-E6 e Calu-3, ou 72 hrs, para THP-1 e Huh-7. O limite mínimo aceitável de viabilidade celular para os experimentos com EFV foi de 80%. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTS. A concentração máxima não tóxica foi determinada previamente à realização dos experimentos com os vírus. A concentração máxima não tóxica do EFV em células Huh-7 foi de 15 μ M (**Figura 22A**). O tratamento com EFV 10 μ M reduziu significativamente o número de cópias do RNA viral no sobrenadante de Huh-7 em 24 hpi ($p < 0,01$), enquanto o tratamento com o fármaco, tanto a 5 quanto a 10 μ M, reduziu significativamente a quantidade de RNA do SARS-CoV-2 em 48 hpi ($p < 0,0001$) (**Figura 22B**).

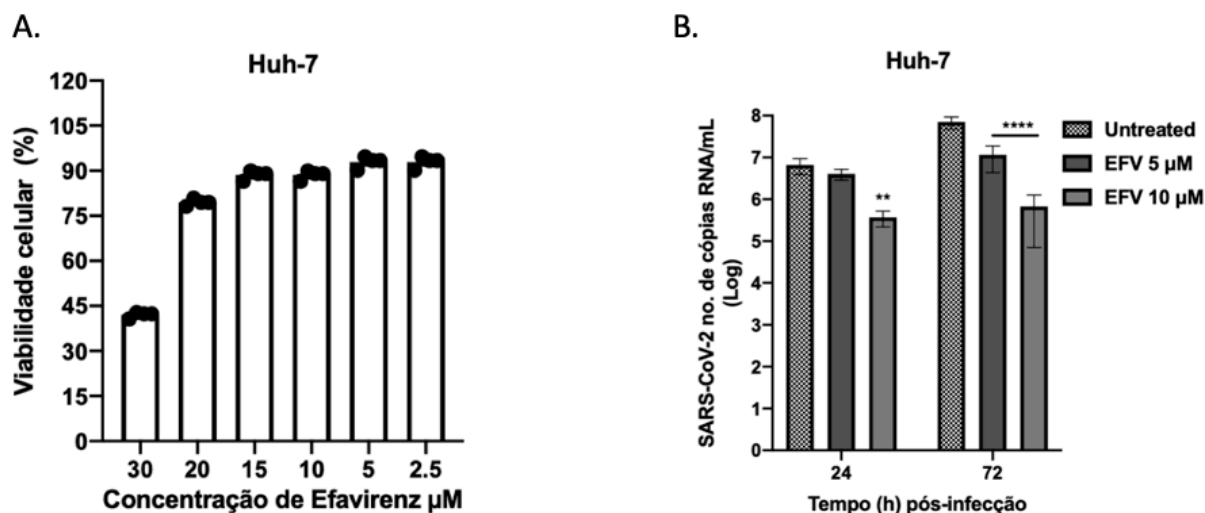


Figura 22 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral do Efavirenz em células Huh-7. (A) Células Huh-7 foram tratadas com EFV em diferentes concentrações por 72 hrs. Em seguida, o perfil de viabilidade celular foi determinado através do ensaio de MTS. (B) Células Huh-7 foram infectadas com SARS-CoV-2 isolado RJ1 (MOI 0,1) e tratadas com EFV em diferentes concentrações. Os sobrenadantes da cultura foram coletados em 24 e 72 hpi para extração do RNA viral e determinação no número de cópias de RNA por qPCR. Os dados mostram média±D.P.M. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ por two-way ANOVA seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas. N=3.

A concentração máxima não tóxica do EFV em Vero E6 foi 15 µM (**Figura 23A**). A partir do perfil de viabilidade, foi calculado o valor de CC_{50} que foi 25,25 µM. Os valores de EC_{50} anti-SARS-CoV-2 em células Vero E6, nos pontos de 24 e 48 hpi (2,81 e 6,43 µM, respectivamente), foi determinado através da redução do número de partículas virais infecciosas pelo ensaio de formação de placa visto em diferentes concentrações de EFV (**Figura 23B**). Os valores do índice de seletividade obtidos a partir dos valores de CC_{50} e EC_{50} , em Vero E6, foram 8,98 e 3,92 para 24 e 48 hrs, respectivamente.

Para avaliar a atividade do EFV contra isolados de diferentes linhagens do SARS-CoV-2, nós infectamos as células Vero E6 com SARS-CoV-2 545, SARS-CoV-2 814 e SARS-CoV-2 RJ1, MOI 0,1. As células foram tratadas com EFV 5 µM por 24 horas após a infecção e, em seguida, determinados o perfil da expressão da proteína Spike intracelular através de Western blot (**Figura 23C**) e os valores arbitrários do nível de expressão da proteína viral foi normalizado pela expressão basal de β -actina (**Figura 23D**). O tratamento com EFV 5 µM reduziu a expressão da proteína Spike de todos os isolados testados (**Figura 23C**). A quantidade de partícula viral infecciosa liberada foi determinada a partir dos sobrenadantes desse mesmo experimento através do ensaio de formação

de placa (**Figura 23E**). Podemos observar que além do impacto na produção intracelular da proteína viral, o tratamento com EFV 5 μ M reduziu significativamente a quantidade de partículas virais infecciosas liberadas por essas células ($p < 0,01$ para SARS-RJ1 e 545; $p < 0,0001$ para SARS-814) (**Figura 23E**).

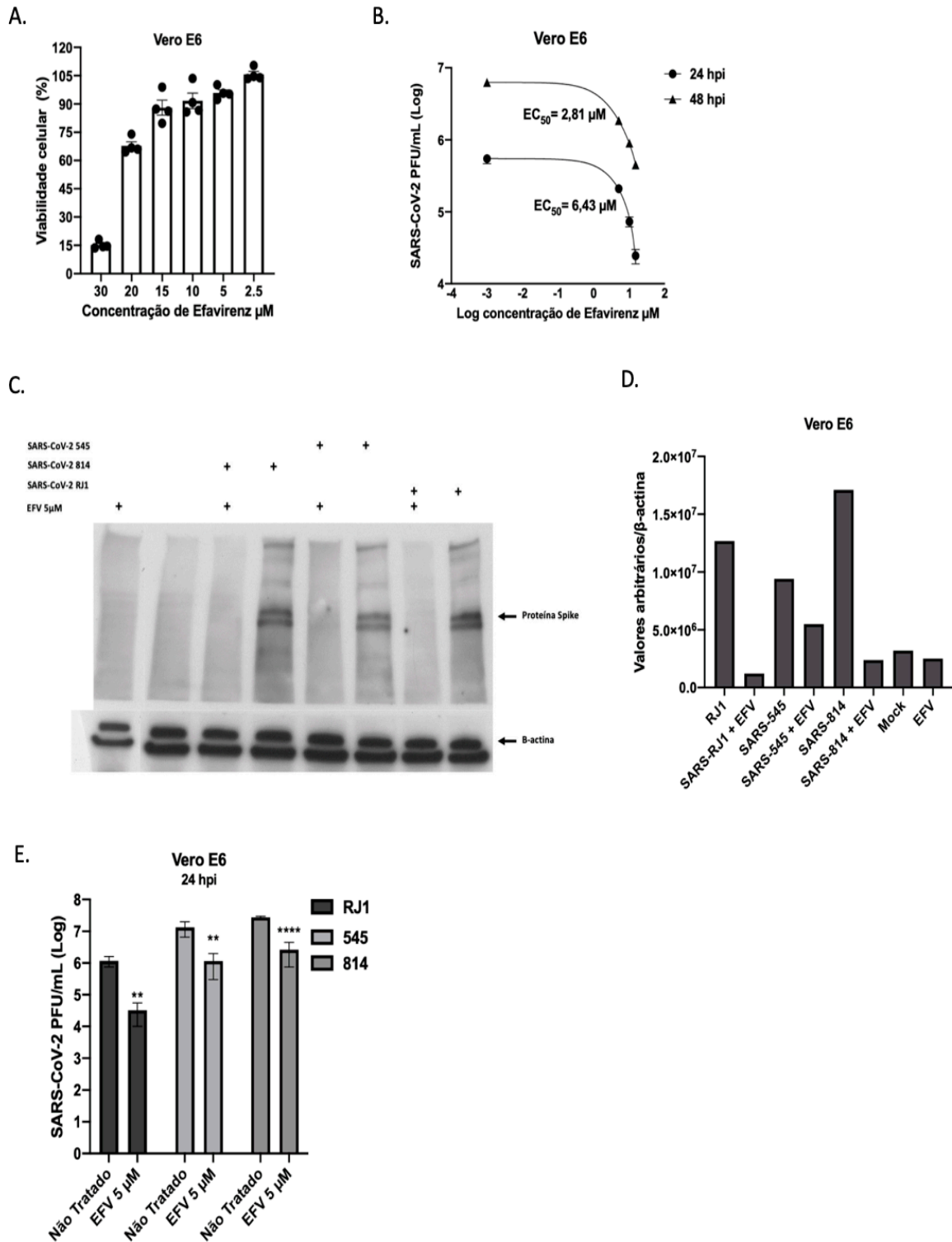


Figura 23 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral do Efavirenz em células Vero E6. (A) Células Vero E6 foram incubadas com diferentes concentrações do EFV por 48 hrs. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTS. (B) Células foram infectadas com SARS-CoV-2 isolado RJ1 (linhagem A2) em MOI 0,1 e incubadas com diferentes concentrações do EFV. Após 24 e 48 hpi, os sobrenadantes foram coletados para quantificação das partículas virais infecciosas liberadas pelo ensaio de formação de placa. Para calcular os valores de EC_{50} , foi utilizada uma curva dose-resposta sigmoidal onde foi plotado o título viral em PFU/ml pela concentração de EFV. (C) As células foram infectadas com SARS-CoV-2 RJ1, SARS-CoV-2 545 e SARS-CoV-2 814 (MOI 0,1) e incubadas com EFV 5 μ M por 24. Em seguida os lisados celulares foram submetidos a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana ligante de proteínas e marcadas com anticorpos específicos para a proteína viral spike e a proteína endógena β -actina como controle. (D) Os níveis de expressão das proteínas foram analisados pelo *software* ImageJ e normalizados pelo nível de expressão basal de β -actina. O gráfico

de barra mostra os valores arbitrários da normalização. (E). Os sobrenadantes da cultura foram coletados após 24 horas de infecção para extração de RNA, seguido quantificação das partículas virais infecciosas por ensaio de formação de placa. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ por two-way ANOVA seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas. Barras representam média \pm D.P.M. N=3.

A concentração máxima não tóxica determinada para o EFV em células Calu-3 foi 15 μ M (**Figura 24A**). As células foram infectadas com três isolados de SARS-CoV-2, pertencentes a diferentes linhagens como dito anteriormente, todas as infecções foram feitas com MOI 0,1. As células foram tratadas, após adsorção viral, com EFV 10 μ M por 24 ou 48 hrs. Nos tempos indicados os, sobrenadantes das culturas foram coletados para quantificação das partículas virais infecciosas liberadas e para quantificação das partículas virais totais liberadas pelo número de cópias do RNA viral por qPCR. A partir dos lisados celulares, nós extraímos o RNA para a detecção do RNA subgenômico (RNAsg) do gene E do SARS-CoV-2 por qPCR. As **figuras 24B e C** mostram o número de cópias do RNA viral e a progênie viral liberada das células infectadas, respectivamente, com o isolado SARS-CoV-2 RJ1 em 24 e 48 horas pós-infecção, para as condições sem tratamento e com EFV 10 μ M. Nós observamos que o tratamento com EFV 10 μ M reduz significativamente a quantidade de RNA viral em 24 ($p < 0,05$) e 48 hpi ($p < 0,001$).

Além disso, nós condensamos os resultados de quantificação das partículas virais infecciosas e do número de cópias do RNA viral para os 3 isolados testados em dois gráficos que mostram o percentual de redução da replicação de SARS-CoV-2 a partir da relação do número de cópias de RNA (**Figura 24D**), obtido por qPCR ou da quantidade de partículas virais infecciosas, por ensaio de redução de placa (ERP) (**Figura 24E**), entre as condições tratadas e não-tratadas, ou. Para os três isolados, o tratamento com EFV reduziu mais de 90% do número de cópias de RNA viral em 24 horas e aproximadamente 80% em 48 horas, sem diferenças entre os isolados (**Figura 24D**). Com relação à liberação de partículas virais infecciosas, o tratamento com EFV reduziu significativamente mais a liberação de partículas infecciosas dos isolados SARS-CoV-2 545 e 814 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) em 24 horas, entretanto o tratamento reduziu em torno de 40% a quantidade de partículas infecciosas do SARS-CoV-2 RJ1 nesse mesmo tempo. Porém, essa

diferença não é mantida em 48 hrs, onde o tratamento com EFV 10 μ M foi capaz de reduzir mais de 80% a liberação de partículas infecciosas dos três isolados sem diferença significativa entre eles (**Figura 24E**).

Além da redução do número de cópias do RNA e da progênie viral, o tratamento com EFV 10 μ M também foi capaz de reduzir a quantidade de RNAsg do SARS-CoV-2. Essa análise foi feita calculando o percentual de inibição do RNAsg, no lisado celular, frente ao tratamento com EFV através de qPCR pelo método do Δ Ct e normalizado pelo GAPDH, como controle endógeno (**Figura 24F**). O tratamento com EFV 10 μ M reduziu o RNAsg em aproximadamente 80%, para o isolado RJ1 e 40%, para os isolados 545 e 814, em 24 hpi. Em 48 hpi, o tratamento reduziu em torno de 80% para os três isolados testados, com maior variação observada para o RJ1, porém sem diferença significativa.

Para investigar se o tratamento interfere na produção de proteína viral intracelular, nós analisamos a expressão da proteína Spike por Western blot nos lisados celulares no tempo de 24 horas pós-infecção (**Figura 24G e H**). Para esse experimento, as células foram infectadas com os 3 diferentes isolados do SARS-CoV-2 (MOI 0,1) e tratadas com EFV 5 e 10 μ M, com exceção do isolado SARS-CoV-2 814 que foi tratado com EFV 10 μ M apenas. O tratamento com EFV foi capaz de reduzir a expressão intracelular da proteína Spike de todos os isolados testados. Nós observamos que o EFV a 10 μ M apresentou maior redução da proteína quando comparado com a concentração de 5 μ M para os isolados SARS-CoV-2 RJ1 e 545 (**Figura 24G**). Os níveis de expressão da proteína Spike foram quantificados e os valores estão apresentados no gráfico de barras normalizados pela expressão da proteína β -actina utilizada como controle endógeno (**Figura 24H**).

Figura 24 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral do Efavirenz em células Calu-3. (A) Células Calu-3 foram incubadas com diferentes concentrações do EFV por 48 hrs. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTS. (B, C) Células foram infectadas com SARS-CoV-2 isolado RJ1 (linhagem A2) em MOI 0,1 e tratadas com EFV 10 μ M. Após 24 e 48 hpi, os sobrenadantes foram coletados para extração de RNA e detecção do RNA viral por qPCR (B) e quantificação das partículas virais infecciosas liberadas pelo ensaio de formação de placa (C). (D, E). As células foram infectadas com SARS-CoV-2 RJ1, SARS-CoV-2 545 e SARS-CoV-2 814 (MOI 0,1) e incubadas com EFV 10 μ M por 24 e 48 hrs. Os sobrenadantes foram coletados nos tempos indicados para extração de RNA e detecção do RNA viral por qPCR e quantificação das partículas virais infecciosas liberadas pelo ensaio de formação de placa. Em (D) o gráfico de barras mostra o percentual de inibição da replicação viral pela relação entre o número de cópias de RNA viral da condição tratada com EFV e não tratada. Em (E) o gráfico de barras mostra o percentual de inibição da replicação viral pela relação entre o número de partículas virais infecciosas da condição tratada com EFV e não tratada. (F). As células foram infectadas com SARS-CoV-2 RJ1, SARS-CoV-2 545 e SARS-CoV-2 814 (MOI 0,1) e incubadas com EFV 10 μ M por 24 e 48 hrs. Em seguida os lisados celulares foram submetidos à extração de RNA para detecção do RNA subgenômico (RNAsg) do gene E do SARS-CoV-2. O percentual de inibição da produção do RNAsg foi obtido pelo método do Δ Ct e normalizado por GAPDH. (G). As células foram infectadas com SARS-CoV-2 RJ1, SARS-CoV-2 545 e SARS-CoV-2 814 (MOI 0,1) e incubadas com EFV 5 e/ou 10 μ M por 24 hrs. Em seguida os lisados celulares foram submetidos à separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana ligante de proteínas e marcadas com anticorpos específicos para a proteína viral spike e a proteína endógena β -actina como controle. (H). Os níveis de expressão das proteínas foram analisados pelo *software* ImageJ e normalizados pelo nível de expressão basal de β -actina. O gráfico de barra mostra os valores arbitrários da normalização. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ por two-way ANOVA seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas. Barras representam média \pm D.P.M. N=3.

A atividade antiviral do EFV contra SARS-CoV-2 RJ1 também foi avaliada em células THP-1, uma linhagem monocítica, e em monócitos primários humanos (**Figura 25**). A infecção nessas células foi feita com MOI 0,1. A concentração máxima não tóxica do EFV em THP-1 foi de 15 μ M (**Figura 25A**). O tratamento com EFV 10 e 15 μ M foi capaz de reduzir significativamente a liberação de partículas virais em 48 hpi ($p < 0,01$ para 10 μ M; $p < 0,001$ para 15 μ M) e 72 hpi ($p < 0,0001$ para as duas concentrações) (**Figura 24B**). Os monócitos primários foram isolados a partir do PBMC de dois doadores sabidamente negativos par COVID-19. Nessas células, o tratamento com EFV 5 e 10 μ M reduziu significativamente o número de cópias de RNA viral no sobrenadante no ponto de 72 hpi ($p < 0,05$ para 5 μ M; $p < 0,01$ para 10 μ M) (**Figura 24C**). Além da redução no número de cópias de RNA viral, o tratamento com EFV reduziu aproximadamente 40% do RNAsg (em 5 μ M) e 70% (em 10 μ M) em 72 hpi, quando comparado com a condição sem tratamento (**Figura 25D**). Apesar de termos avaliado a liberação de partículas virais infecciosas apenas em um doador, nós observamos que o tratamento com EFV tanto a 5, quanto a 10 μ M, foi capaz de reduzir a progênie viral vista no sobrenadante da cultura em 72 hpi (**Figura 25E**).

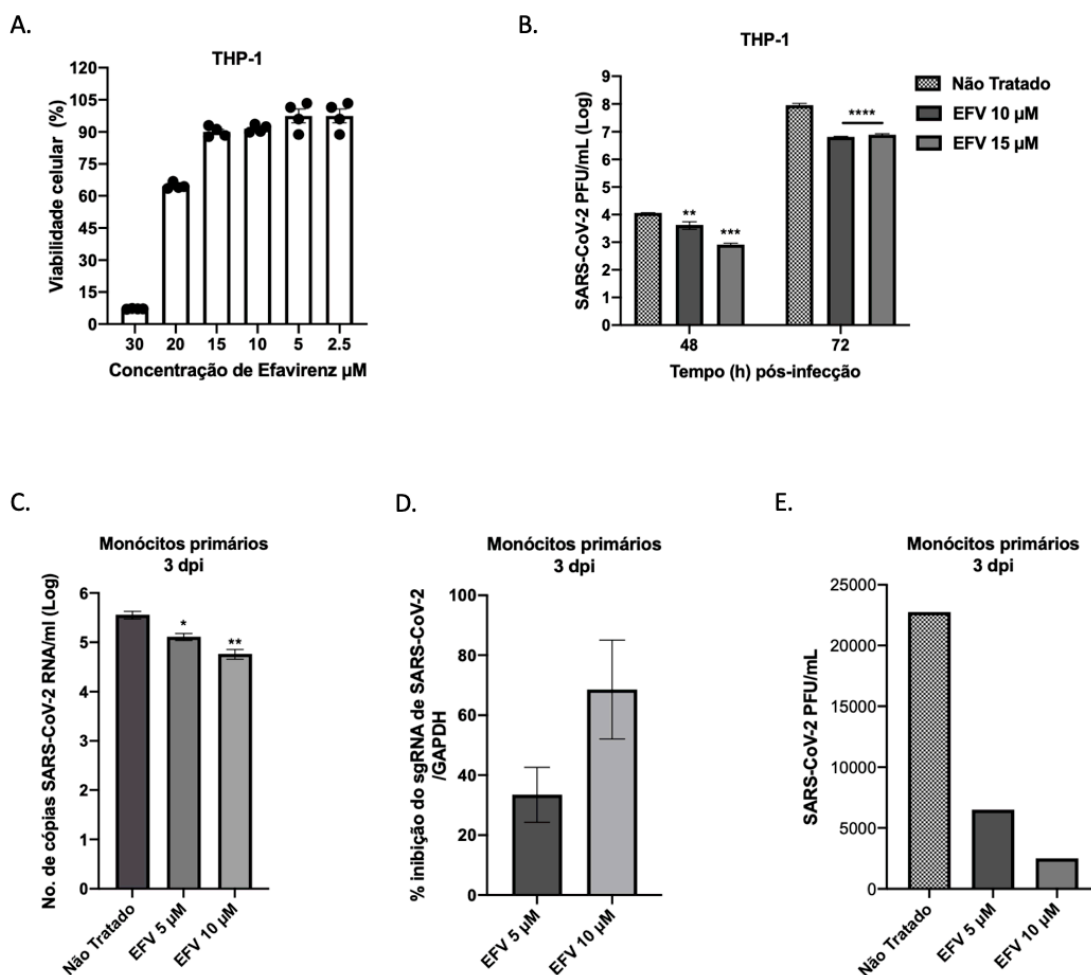


Figura 25 Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral do Efavirenz em células THP-1 e monócitos primários humanos. (A). Células foram incubadas com diferentes concentrações do EFV por 72 hrs. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTS. (B) Células THP-1 foram infectadas com SARS-CoV-2 isolado RJ1 (linhagem A2) em MOI 0,1 e tratadas com EFV 10 e 15 µM. Após 48 e 72 hpi, os sobrenadantes foram coletados para quantificação das partículas virais infecciosas liberadas pelo ensaio de formação de placa. (C). Os monócitos primários (isolados de PMBC de três doadores) foram infectados com SARS-CoV-2 isolado RJ1 em MOI 0,1 e tratados com EFV 5 e 10 µM por 72 hrs. Em seguida os sobrenadantes foram coletados para extração de RNA e detecção do RNA viral quantificação do número de cópias de RNA por qPCR. (D). Os monócitos primários foram infectados com SARS-CoV-2 isolado RJ1 em MOI 0,1 e tratados com EFV 5 e 10 µM por 72 hrs. Em seguida os lisados celulares foram submetidos à extração de RNA e detecção do RNAsg por qPCR. O percentual de inibição da produção do RNAsg foi obtido pelo método do ΔC_t e normalizado por GAPDH. (E). Os monócitos primários foram infectados com SARS-CoV-2 isolado RJ1 em MOI 0,1 e tratados com EFV 5 e 10 µM por 72 hrs. Em seguida os sobrenadantes foram coletados para quantificação das partículas virais infecciosas pelo ensaio de redução de placa. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por two-way ANOVA seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas. Barras representam média \pm D.P.M. N=3.

O Tratamento com EFV conseguiu reduzir significativamente a replicação do SARS-CoV-2 em células relevantes para a patogênese da COVID-19 com reduzida toxicidade associada. Demonstrando a importância de investigar o potencial desse fármaco tanto para o tratamento da COVID-19.

6 DISCUSSÃO

Durante a realização desse trabalho, nós avaliamos a atividade antiviral dos ProTides UMN-1001, UMN-1002 e do análogo de nucleosídeo 2'C-β-metilguanossina, referido aqui como composto 1, contra DENV e ZIKV. O análogo de nucleosídeo 2'C-β-Me-G foi sintetizado originalmente como um inibidor da RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) do HCV. Esse composto também possui atividade *in vitro* contra DENV-2 devido às similaridades genéticas entre as polimerases desses vírus (MIGLIACCIO et al., 2003; NG; ARNOLD; CAMERON, 2008b; SIZUN et al., 2015). Apesar da elevada potência farmacológica mostrada *in vitro* para o 2'C-β-Me-G contra DENV2 em células Huh7 ($EC_{50} = 13,6 \mu\text{M}$), a conversão desse pró-fármaco à sua forma metabolicamente ativa, 5'-trifosfato, é limitada pela primeira reação de fosforilação uma vez que ele é alvo da ação de cinases intracelulares (STEIN; MOORE, 2001)

Para contornar essa limitação, UMN-1001 e UMN-1002 foram sintetizados a partir de alterações químicas na molécula do 2'C-β-Me-G, gerando pró-drogas já monofosfatadas (pró-nucleotídeos). Nosso grupo demonstrou que os compostos UMN-1001 e UMN-1002 apresentam atividade antiviral contra DENV2 superior ao composto 1 em células Vero, confirmando o sucesso da abordagem dos ProTides (OKON et al., 2017a). Dando seguimento a este trabalho, nós investigamos a atividade antiviral desses ProTides contra DENV2 em células endoteliais humanas (HBMEC) devido ao importante papel das células endoteliais na patogênese da dengue em humanos.

Nosso grupo também realizou a caracterização da atividade desses ProTides contra ZIKV utilizando linhagens de células relevantes para a patogênese do ZIKV além de um modelo de infecção em camundongos neonatos selvagens previamente descrito como ferramenta importante para investigar a infecção viral, particularmente, no sistema nervoso central (NEM DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2018)

Considerando os valores de EC_{50} , foi possível observar que o tratamento com UMN-1002 apresentou 5 vezes mais capacidade de reduzir a replicação de DENV2 em células Vero quando comparado com o composto parental 1. Não observamos diferenças entre o tratamento com UMN-

1001 e 1 em reduzir a replicação viral. De maneira similar, em células HBMEC o tratamento com UMN-1002 foi capaz de reduzir a replicação viral aproximadamente 5 vezes mais que o composto parental 1 e UMN-1001, sem diferença significativa entre esses dois últimos (**Tabela 6**). Na infecção pelo ZIKV, similar ao que vimos para DENV, a atividade dos compostos ProTides também apresentou um valor de EC_{50} menor que o EC_{50} do composto parental (1) em todas as células avaliadas (**Tabela 7**), demonstrando o potencial de uso desses compostos contra flavivirus relacionados.

Esses resultados sugerem, que do ponto de vista biológico, a conversão do 2'C- β -Me-G (1) à sua forma monofosfatada pelas cinases celulares ocorre com eficiência similar à conversão do composto UMN-1001 pela Hint1 celular ao 2'C- β -Me-G monofosfatado. Além disso, nossos resultados também apontam que UMN-1002 é capaz de penetrar as células e entregar 2'C- β -Me-G monofosfatado de maneira mais eficiente que a entrega feita pelo UMN-1001, apesar da etapa anquimérica adicional na ativação do UMN-1002, antes que ele seja clivado por Hint1.

A necessidade de Hint1 na ativação dos ProTides foi confirmada através da demonstração de que a atividade antiviral de cada um dos ProTides é expressivamente reduzida quando esses compostos são incubados em associação ao inibidor farmacológico de Hint1, TrpGc (Figura 12A e B). Em conjunto, esses dados apontam que o mascaramento do grupo fosfato feito pelo grupamento 2-(metiltio)etil pode ser incorporado a um pronucleotideo fosforamidato e que a utilização desse grupamento fornece um método não-enzimático alternativo para a liberação intracelular de fosforamidatos monoésteres que, sequencialmente, passarão pela clivagem da ligação P-N mediada por Hint1 para que seja feita a entrega do nucleosídeo monofosfato.

De maneira relevante, o EC_{50} dos ProTides testados na infecção pelo ZIKV aqui variaram entre 0,2 e 1,0 μ M com índices de seletividade, em média, maiores que 200, por tanto, sugerindo que esses compostos apresentam significativa atividade antiviral e baixa toxicidade celular associada (**Tabela 7**). Os estudos de viabilidade celular sugerem que UMN-1002 pode apresentar maior toxicidade que 1 e UMN-1002 (**Figura 11**), contudo os nossos estudos em animais

demonstraram que o tratamento com 1 e UMN-1001, na dose de 25 mg/kg/dia foi letal, enquanto UMN-1002 não apresentou toxicidade nesta dose, além de ter reduzido significativamente a carga do ZIKV nos tecidos cerebrais e oculares (**Figura 15E, F**).

A observação de toxicidade, principalmente hepática, é um dos principais motivos para a terminação de estudos clínicos com análogos de nucleosídeo/nucleotídeo (FENG et al., 2018). A ação dos análogos de nucleosídeo/nucleotídeo sobre as polimerases do hospedeiro tem sido apontada como a principal causa de toxicidade (JOHNSON et al., 2001). Semelhante ao que observamos para UMN-1001 e 1, o análogo de guanosina PSI 938, um 2'F 2'C-Metilguanossina, não apresentou toxicidade nos estudos *in vitro*, porém foi retirado de estudo clínico por apresentar toxicidade *in vivo* (FENG et al., 20016). As alterações químicas feitas na molécula do 2'C-β-Me-G para a síntese do UMN-1002 podem ter sido responsáveis por deixá-lo menos tóxico *in vivo* provavelmente por maior seletividade pelo seu alvo viral, tendo em vista os valores do índice de seletividade desse composto nas linhagens celulares utilizadas, mas estudos específicos precisam ser realizados para testar a hipótese, uma vez que a toxicidade de análogos de nucleosídeo/nucleotídeo tem-se mostrado difícil de ser previsto (JOHNSON et al., 2001; FELD et al., 2014).

Independente da linhagem celular testada, o ProTide UMN-1002 apresentou a atividade antiviral mais potente para os flavivirus estudados aqui. Tem sido demonstrado que os inibidores da RdRp de flavivírus são capazes de inibir a infecção por ZIKV tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BERNATCHEZ et al., 2020b). Por exemplo, o composto 7-deaza-2'-C-metiladenosina (7DMA) foi capaz de reduzir a viremia e a progressão da doença em camundongos deficientes na resposta a interferons (AG129) com EC₅₀ variando de 1,2 e 9,6 μM em células Vero (ZMURKO et al., 2016). Outros compostos com a modificação 2'-C-metil (2'-C-metiladenosina, citidina e uridina), também exibiram atividade contra ZIKV, embora com valores de EC₅₀ mais elevados, na faixa micromolar (EYER et al., 2016; ZMURKO et al., 2016).

Um estudo prévio demonstrou que o Sofosbuvir, um ProTide anti-HCV, também apresenta atividade contra ZIKV *in vitro* de forma dependente do tipo celular (MUMTAZ et al., 2017). Em células SH-Sy5y, o Sofosbuvir apresentou EC₅₀ de 1,1 µM e índice de seletividade de 384 (SACRAMENTO et al., 2017). Em comparação, o ProTide UMN-1002 apresentou EC₅₀ duas vezes menor, e um índice de seletividade maior que 465. Foi demonstrado que o tratamento com Sofosbuvir protege camundongos Swiss neonatos da letalidade pelo ZIKV além de reduzir a carga viral, vista pela presença de RNA viral, no cérebro, baço, plasma e rim (FERREIRA et al., 2017).

Em nosso estudo, a letalidade não pode ser utilizada como parâmetro uma vez que os animais foram infectados com 10⁵ PFU, e nesses modelos, letalidade e perda de peso significativa apenas foram vistos a partir de duas semanas após a infecção (NEM DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2018), enquanto no trabalho de Ferreira e colaboradores, os animais foram infectados com uma quantidade de vírus 100 vezes maior. Entretanto, nós observamos redução significativa não apenas da quantidade de RNA nos tecidos analisados, mas também da quantidade de partícula viral infecciosa com o tratamento com UMN-1002. Além disso, embora perda de peso não seja um parâmetro que apresente significativa alteração na primeira semana de infecção, os animais tratados com UMN-1002 apresentaram um perfil de variação de peso similar aos animais do grupo mock (**Figura 15C**). Esses resultados, em conjunto com os dados *in vitro* sugerem a possibilidade de testar o tratamento com UMN-1002 na infecção por DENV *in vivo*.

Os nossos dados mostram que UMN-1002 apresenta atividade antiviral relevante em células do sistema nervoso central, além disso, apresenta grande capacidade de reduzir tanto o RNA quanto as partículas infecciosas do ZIKV nos tecidos cerebrais e oculares, sugerindo que esse composto pode ser uma alternativa para o controle da infecção sistêmica pelo ZIKV. Entretanto, a atividade antiviral *in vivo* foi testada apenas no cérebro e olho, para contornar essa limitação nós pretendemos verificar outros tecidos periféricos, além da viremia, e em tempos diferentes onde talvez possa ficar mais clara a eficiência no controle da carga viral. Outro ponto importante a ser investigado é se o tratamento com UMN-1002 é capaz de proteger os camundongos das

consequências tardias da infecção com ZIKV como lesão tecidual e convulsões. Esses estudos farão parte de um projeto maior onde iremos avaliar tanto o UMN-1002 quanto outros ProTides análogos de guanosina estruturalmente diferentes em seus grupos de mascaramento do grupamento fosfato contra ZIKV e DENV *in vivo*.

A outra abordagem terapêutica antiviral proposta para o uso de compostos ProTides nesse trabalho baseia-se na inibição da via canônica (dependente de cap) da iniciação da tradução. Através dessa abordagem, nós testamos os ProTides antagonistas de eIF4E, 4Ei-10 e 4Ei-11, contra ZIKV e SARS-CoV-2. Esses compostos são metabolizados intracelularmente gerando o 7-Cl-Fenol-Etil-GMP, um análogo de cap (Me^7 -GTP), que inibe a tradução proteica através da ligação e sequestro de eIF4E, por tanto, impedindo que este fator se ligue ao RNAm capeado (AHMAD et al., 2020). Ambos ProTides foram sintetizados para uso contra diferentes tipos de câncer, uma vez que a célula tumoral apresenta elevada síntese de proto-oncogenes e, virtualmente, todo RNAm eucariótico apresenta a presença da estrutura cap no seu terminal 5' (AHMAD et al., 2020; JACOBSON et al., 2021).

Entretanto, não existe relato na literatura da atividade antiviral desses compostos. Uma vez que todos os vírus descritos até agora, utilizam a maquinaria de síntese proteica da célula hospedeira, e sabendo que ZIKV e SARS-CoV-2 apresentam como genoma uma fita simples de RNA de polaridade positiva que possui em sua extremidade 5' uma estrutura Me^7 -GTP, assume-se que a síntese das proteínas desses vírus, durante a infecção, ocorra predominantemente pela via canônica dependente de cap (BANERJEE et al., 2020; DAVID J. BARTON; B. JOAN MORASCO; JAMES B. FLANEGAN*, 1999; NAKAGAWA; LOKUGAMAGE; MAKINO, 2016; SANFORD et al., 2019). Por tanto, o antagonismo de eIF4E, utilizando esses ProTides, surge como uma abordagem terapêutica interessante a ser avaliada.

O perfil de toxicidade celular do 4Ei-11 foi utilizado para determinar as concentrações testadas contra o ZIKV nas células HEK 293 e SH-Sy5y, enquanto 4Ei-10 e 4Ei-11 foram avaliados

quanto sua toxicidade nas células Calu-3 previamente à infecção com SARS-CoV-2. Os dados da atividade antiviral foram obtidos utilizando concentrações não tóxicas dos compostos.

A atividade anti-ZIKV foi avaliada apenas com o ProTide 4E-11 até o momento, porém estudos com 4Ei-10 estão em andamento. Devido à relevância da infecção por ZIKV no sistema nervoso central (SNC), além de avaliarmos a atividade do 4Ei-11 em células HEK 293, linhagem de células de rim embrionados humanos, nós confirmamos os resultados em neuroblastoma SH-Sy5y, pois são células relevantes para a patogênese do ZIKV no SNC. As células HEK 293, embora não sejam um modelo para estudar a patogênese do ZIKV, são originadas de uma estrutura precursora adrenal, que durante o desenvolvimento é adjacente ao rim. A medula adrenal tem origem na crista neural, o que explica o perfil de expressão de diferentes genes neuronais em HEK 293 (LIN et al., 2014; SHAW et al., 2002).

Nossos dados mostram a dependência do ZIKV da via cap-dependente para a síntese de suas proteínas, uma vez que o antagonismo de eIF4E impacta diretamente nos efeitos deletérios da infecção prevenindo a citotoxicidade e reduzindo a produção de progênie viral infecciosa em até 1 log em células SH-Sy5y (**Figura 17B**). Esses dados confirmam o que foi previamente demonstrado experimentalmente *in vitro* sobre a utilização da via dependente de cap pelo RNA genômico do ZIKV (SANFORD et al., 2019)

Entretanto não exclui a possibilidade de que esse vírus utilize uma via independente de cap uma vez que o tratamento não interrompeu completamente a infecção e, além disso, já tem sido demonstrado que a região 5' não traduzida de ZIKV pode possuir um sítio interno de entrada ribossomal (IRES) não canônico, uma vez que o genoma viral artificialmente não capeado consegue iniciar a infecção em células de mamíferos (SONG et al., 2019b). No entanto, pelos dados apresentados aqui, a infecção pelo ZIKV depende majoritariamente de eIF4E disponível para a síntese das proteínas virais. Independente da possibilidade do uso de outra via além da dependente de cap, nossos dados apontam o potencial de uso do 4Ei-11 não apenas para o controle da infecção por ZIKV, mas também como importante ferramenta de estudo de etapas importantes para a

biossíntese viral, podendo inclusive ser utilizado para vírus não relacionados, mas que utilizam dessa via para a síntese de suas proteínas, como evidenciado pelos resultados obtidos na infecção com SARS-CoV-2.

A atividade antiviral de 4Ei-10 e 4Ei-11 contra SARS-CoV-2 analisada por microscopia confocal com automatização para triagem de alto conteúdo, nos permitiu quantificar a presença da proteína Spike do SARS-CoV-2 e do RNAdf intermediário de replicação nas células Calu-3 infectadas. O tratamento com 4Ei-10 e 4Ei-11 foi eficaz em reduzir significativamente a presença da proteína Spike, do RNAdf e da progênie viral infecciosa liberada das células Calu-3 em 24 e 48 hpi (**Figuras 18 e 19**). A redução da presença da proteína Spike nas células infectadas nos mostra que o tratamento com ambos ProTides está de fato inibindo a síntese proteica e, conseqüentemente, é esperado que também ocorra a redução do RNAdf uma vez que, no ciclo replicativo viral, a etapa de transcrição do material genético depende de proteínas não estruturais sintetizadas na etapa de tradução do RNAm genômico que irão constituir o complexo replicativo (V'KOVSKI et al., 2021b).

Interessantemente, o tratamento com 4Ei-10, em todas as concentrações testadas, inibiu completamente a presença de partículas virais infecciosas liberadas das células infectadas em 48 hpi, enquanto o 4Ei-11 apresentou um perfil semelhante para quase todas as concentrações testadas, onde observamos a presença de partículas virais infecciosas em apenas uma replicata das condições tratadas com 4Ei-11 em 0,19 e 0,09 μ M. Esses dados indicam a grande dependência do SARS-CoV-2 sobre a via canônica dependente de cap para a síntese das suas proteínas, além de demonstrar o potencial terapêutico de utilizar essa via como alvo para o controle da infecção

A diferença estrutural 4Ei-10 e 4Ei-11 consiste na presença de um grupamento 2-(metiltio)butil ligado ao farmacóforo na molécula do 4Ei-11, enquanto o 4Ei-10 possui um grupamento 2-(metiltio)etil. A presença do grupamento com maior cadeia carbônica no 4Ei-11 foi idealizada para tornar essa molécula mais lipofílica, facilitando sua passagem pela membrana plasmática. Como consequência farmacocinética dessa diferença estrutural, observou-se que o

tempo de meia-vida, em pH=7,2, para o 4Ei-11 é de 10,5 horas, enquanto o 4Ei-10 tem um tempo de meia-vida de 8 horas (dados não publicados). O fato de termos visto inibição total das partículas virais infecciosas em todas as concentrações do 4Ei-10, e até em 0,38 μM de 4Ei-11, mesmo depois de transcorridos 6 e 4,5 tempos de meia-vida para o 4Ei-10 e 4Ei-11, respectivamente, nos mostra o grande potencial terapêutico desses ProTides e da iniciação da tradução dependente de cap como alvo para o tratamento da infecção pelo SARS-CoV-2.

Para melhor interpretação dos nossos resultados com esses ProTides contra o SARS-CoV-2, nós iremos avaliar a atividade antiviral em tempo mais recentes da infecção, uma vez que em 24 horas de infecção já ocorreu mais de um ciclo completo de replicação viral. Além disso, nós iremos demonstrar o mecanismo molecular da inibição da iniciação através da análise dos níveis de expressão de eIF4E nas células infectadas e tratadas com ambos ProTides. Interessantemente, não observamos uma relação direta entre o aumento da concentração e a eficácia do tratamento sobre a infecção. Por exemplo, o tratamento com 4Ei-11 a 0,09 μM , em 24 hrs, reduz mais efetivamente a quantidade das partículas virais infecciosas enquanto a concentração 3 μM parece não ter efeito, porém todas as concentrações, exceto 0,19 e 0,09 μM inibem totalmente o título viral em 48 horas pós-infecção. Esse perfil de resposta nos impossibilitou de calcular os valores de EC_{50} para esses compostos, por tanto nós iremos avaliar a atividade antiviral em concentrações ainda menores para obtermos esses valores em 48 horas pós-infecção.

Além da investigação da atividade antiviral dos compostos ProTides, durante a realização desse trabalho nós também investigamos a atividade do Efavirenz (EFV) contra SARS-CoV-2 em uma abordagem proposta de redirecionamento de fármacos. Os estudos de redirecionamento de fármacos antirretrovirais para uso em infecções virais não relacionadas têm crescido nos últimos anos (MERCORELLI; PALÙ; LOREGIAN, 2018). Entre as vantagens do redirecionamento de medicamentos clinicamente aprovados temos que o perfil de toxicidade e segurança para uso em humanos já é conhecido, assim como as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, por tanto, impactando diretamente no custo e no tempo do processo do desenvolvimento da terapia.

O Efavirenz é um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa do HIV com uso na clínica há mais de duas décadas na terapia combinada antirretroviral, e sua atividade antiviral é devido à formação de uma bolsa hidrofóbica próximo ao sítio ativo da transcriptase reversa, alterando a conformação do sítio de ligação do substrato natural, com consequente redução da atividade de polimerase dessa enzima (BASTOS et al., 2016; DESTEFANO, 2019). Evidências pré-clínicas têm demonstrado a atividade biológica do EFV contra leishmaniose, Doença de Alzheimer e câncer pancreático (COSTA et al., 2016; HECHT et al., 2017; PETROV et al., 2019).

Utilizando análise computacional para o estudo de interação entre droga e alvo, foi demonstrado que a molécula do EFV provavelmente consegue interagir com sequências específicas de aminoácidos presentes nas proteínas não estruturais nsp5 (codificante da M^{PRO}), nsp12 (codificante da RpRd), nsp13 (codificante da Helicase), nsp14 (codificante da 3' 5' exorribonuclease), nsp15 (codificante da Endorribonuclease), e nsp16 (codificante da 2'-O-metiltransferase) do SARS-CoV-2, porém não há relatos na literatura demonstrando a atividade biológica do EFV contra o SARS-CoV-2, ou se de fato, ele interage com alguma dessas proteínas (BECK et al., 2020).

Nesse trabalho, nós investigamos a atividade biológica do EFV contra isolados clínicos virais pertencentes a diferentes linhagens do SARS-CoV-2 em células Vero E6, Huh-7, Calu-3, THP-1 e monócitos humanos primários. Os experimentos em Calu-3 e Vero E6 foram realizados com três diferentes isolados virais: SARS-CoV-2 545 (linhagem: B.1.1.33), SARS-CoV-2 814 (linhagem P.2) e SARS-CoV-2 RJ1 (linhagem A2). Nas demais células, as infecções foram feitas com o isolado SARS-CoV-2 RJ1. No estado do Rio de Janeiro, a linhagem B.33 predominou as infecções entre março e setembro de 2020, seguido por um pico de frequência dos casos de infecções pela linhagem P.2 entre setembro de 2020 e fevereiro de 2021. O vírus da linhagem A2 é o mais próximo da cepa original que surgiu na cidade de Wuhan, China, e atualmente aparece com baixa de frequência dos casos registrados.

O fígado é um dos alvos do SARS-CoV-2 após sua disseminação sistêmica. A infecção hepática promove alterações nos níveis das transaminases, o que pode contribuir para o comprometimento funcional desse órgão (WANG et al., 2020c). As células hepáticas constituem um modelo relevante para o estudo da resposta imunológica contra vírus, além de serem utilizadas na pesquisa pré-clínica como modelos para desenvolvimento e triagem de drogas contra diferentes vírus não necessariamente hepáticos (BARROWS et al., 2016; CHEN et al., 2016). O tratamento com o EFV a 5 e 10 μM reduziu significativamente a quantidade de RNA do SARS-CoV-2, isolado da linhagem A2, em células Huh-7 em 24 e 72 horas após a infecção (**Figura 22**).

Embora as células Vero E6 não sejam de linhagem humana, seu uso em pesquisas de desenvolvimento de novos antivirais ou reposicionamento de fármacos para o tratamento da COVID-19 tem sido bastante difundido (CAGNO, 2020; GARCIA et al., 2021; RIVA et al., 2020; YAN et al., 2021). O tratamento com EFV a 5 μM reduziu significativamente a quantidade de partículas virais infecciosas dos três isolados diferentes do SARS-CoV-2 testados em 24 hrs, além de ter apresentado importante capacidade de reduzir a expressão da proteína Spike nos lisados celulares, independente o isolado testado, a níveis comparáveis com os observados na condição de célula não infectada (**Figura 23**). Os valores de EC_{50} calculados pela redução das partículas virais infecciosas em células Vero E6 foram 2,81 e 6,43 μM em 24 e 48 hpi, respectivamente. Nessas células o EFV apresentou valor de $\text{CC}_{50} = 25,25 \mu\text{M}$. A partir desses valores, o índice de seletividade calculado foi de 8,98 e 3,92 para 24 e 48 hpi, respectivamente.

Outros antirretrovirais foram investigados em células Vero E6 para uso na infecção por SARS-CoV-2. O Tenofovir, inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo, a 100 μM foi capaz de reduzir o efeito citopático causado pelo SARS-CoV-2, mas seus valores de EC_{50} e CC_{50} não foram calculados. O Lopinavir, inibidor da protease, apresentou CC_{50} de 49,75 μM e EC_{50} de 26,63 μM em 48 hpi, com índice de seletividade de 1,86 (CHOY et al., 2020). Apesar do EFV ter apresentado CC_{50} aproximado à metade do valor do Lopinavir, o EC_{50} e o índice de seletividade do EFV são, pelo menos 4 e 2 vezes maiores que os do Lopinavir, respectivamente, o que sugere

grande potencial do EFV em controlar a infecção pelo SARS-CoV-2. Para confirmar os resultados encontrados até aqui, nós utilizamos outras células relevantes à infecção pelo SARS-CoV-2.

Os monócitos circulantes estão envolvidos na patogênese da COVID-19 uma vez que essas células em conjunto com outras células do grupo dos fagócitos mononucleares, quando ativados, induzem respostas imunes por citocinas e outros mediadores inflamatórios agravando a doença ao longo do seu curso e podendo levar aos casos letais de síndrome hiper inflamatória (MARTINEZ et al., 2020). Foi demonstrado que a infecção por SARS-CoV-2 induz inflamassoma e piroptose em monócitos de pacientes com formas graves de COVID-19 (FERREIRA et al., 2021).

Nós observamos que o EFV possui atividade contra SARS-CoV-2 em células THP-1 de linhagem monocítica e em monócitos primários humanos isolados de PBMC de doadores negativos para a COVID-19. O tratamento com EFV 10 e 15 μM reduziu significativamente a quantidade de partículas virais infecciosas liberadas em 48 e 72 hpi das células THP-1 (**Figura 25B**). Nos monócitos humanos primários, o tratamento com EFV 5 e 10 μM reduziu a quantidade total de RNA de SARS-CoV-2, isolado da linhagem A2, dos sobrenadantes em aproximadamente 0,5 e 1 log, respectivamente em 72 hpi (**Figura 25C**). Além disso, EFV 10 μM inibiu cerca de 60% a formação do RNAsg também em 72 hpi (**Figura 25D**). Apesar de ser sido feito com amostra de apenas um doador, podemos observar uma tendência à redução das partículas virais infecciosas com o tratamento com EFV 5 e 10 μM (**Figura 25E**). A atividade antiviral do EFV nessas células sugere que o EFV pode controlar a resposta inflamatória induzida pelo SARS-CoV-2, porém para confirmar essa hipótese estudos avaliando marcadores pró-inflamatórios precisam ser feitos.

As células epiteliais de pulmão humano, Calu-3, são modelos adequados para estudos de patogênese e triagem de drogas para a COVID-19 por sua semelhança com os sítios naturais de infecção pelo SARS-CoV-2 em humanos. Nessas células, semelhante ao que foi visto nas células Vero E6, independente da linhagem de SARS-CoV-2, o tratamento se mostrou eficaz em inibir a replicação viral. Outro parâmetro utilizado para demonstrar a replicação viral é a presença do RNAsg, e o tratamento com EFV 10 μM mostrou-se eficaz em inibir da formação do RNAsg dos

três isolados. Além da redução da replicação viral, nessas células, o tratamento com EFV exerceu grande impacto na redução dos níveis de expressão da proteína viral Spike intracelular.

O uso clínico de antirretrovirais para o tratamento da COVID-19 foi considerado a partir dos ensaios *in vitro* e de análise computacional. Estudos clínicos foram feitos com o Lopinavir, associado ao Ritonavir (inibidor da protease do HIV), ou com Darunavir (inibidor da protease do HIV) também em associação ao Ritonavir. Contudo, os estudos que avaliaram o potencial benefício do uso desses antirretrovirais não encontraram evidências suficientes de que esses fármacos reduzam a mortalidade, a gravidade da doença ou o *clearance* viral (HORBY et al., 2020; “Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results,” 2021; SIEMIENIUK et al., 2020).

Até o momento, o único fármaco aprovado pela agência reguladora americana FDA para o tratamento da COVID-19, é o Remdesivir, um análogo de adenosina, originalmente desenvolvido para o tratamento da infecção pelo vírus ebola. Na infecção pelo SARS-CoV-2, ele atua como inibidor da RpRd, adicionando 3 nucleotídeos na fita de RNA viral antes de interromper a atividade da polimerase e apresenta valor de $EC_{50} = 23,15 \mu\text{M}$ sendo, pelo menos 3 vezes maior que o encontrado para o EFV nesse trabalho (CHOY et al., 2020; KOKIC et al., 2021). A desvantagem do Remdesivir é que sua molécula não é biodisponível quando administrado por via oral, sendo seu uso restrito à administração intravenosa, limitando seu uso aos pacientes internados.

É importante notar que um fármaco redirecionado não deve, necessariamente, atuar através do mesmo mecanismo que ele exerce no tratamento da condição para a qual ele foi originalmente desenvolvido. As evidências científicas que suportam o redirecionamento do EFV para o tratamento do Mal de Alzheimer, apontam que esse fármaco atua através da ativação da enzima hidrolase de colesterol CYP46A1 (PETROV et al., 2019). O uso do EFV para o tratamento de câncer de pâncreas é baseado na sua capacidade de indução de estresse oxidativo e despolarização de membrana mitocondrial (HECHT et al., 2017).

O valor calculado de EC_{50} para o EFV contra o HIV-1 selvagem é de 0,5 nM (KODAMA et al., 2008), enquanto contra SARS-CoV-2 demonstramos ser 2,81 e 6,43 μ M em 24 e 48 hrs, respectivamente, suportando a hipótese de que ele, provavelmente, atue como antiviral de ação indireta, modulando uma via alternativa relevante para infecção produtiva do SARS-CoV-2. Dados não publicados do nosso grupo apontam que a atividade do EFV contra o vírus Chikungunya ocorra via modulação de estresse oxidativo e autofagia. A infecção por SARS-CoV-2 está relacionada à indução de estresse oxidativo e modulação do fluxo autofágico (CHERNYAK et al., 2020; SHOJAEI et al., 2020). O Efavirenz é um indutor de estresse oxidativo e autofagia em diferentes tecidos (DONG et al., 2013; HECHT et al., 2017; PURNELL; FOX, 2014). O mecanismo molecular de ação do EFV na infecção por SARS-CoV-2 está sendo investigado pelo nosso grupo a partir das hipóteses de provável modulação dessas vias geradas neste estudo.

7 CONCLUSÃO

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar a atividade antiviral de compostos pró-nucleotídeos contra DENV, ZIKV e SARS-CoV-2 e investigar o potencial uso do antirretroviral Efavirenz na infecção por SARS-CoV-2, utilizando modelos celulares e, quando aplicável, modelo animal relevantes à patogênese viral.

A partir dos experimentos com os ProTides inibidores da polimerase UMN-1001, UMN-1002 e com o análogo de nucleosídeo parental 1, podemos concluir que a abordagem utilizada para as modificações química-estruturais sobre a molécula do 2'-C-β-Metilguanossina resultaram em ProTides com atividade antiviral superior à pró-droga parental. Vimos em células Vero que UMN-1002 e UMN-1002 possuem maior atividade contra o DENV-2 quando comparado ao 2'-C-β-Metilguanossina. Em células endoteliais humanas, HBMEC, UMN-1002 conseguiu reduzir 5 vezes mais a replicação de DENV-2 quando comparado ao composto parental e ao UMN-1001.

A atividade superior do UMN-1002, *in vitro*, tanto contra DENV-2 quanto contra ZIKV, nos mostra que, mesmo esse composto precisando passar por uma etapa de ativação química antes que ele seja clivado por Hint1 e di e tri-fosforilado para gerar o metabólito farmacologicamente ativo, ele é capaz de penetrar as células e entregar 2'-C-β-Me-Gmonofosfatado de maneira mais eficiente que a entrega feita pelo UMN-1001.

Os baixos valores de EC₅₀ e a reduzida toxicidade celular associada ao UMN-1001 e ao UMN-1002 refletem em altos valores de índices de seletividade, provando que esses compostos são direcionados aos vírus com baixa possibilidade de atuação em outros alvos gerando efeitos tóxicos. Ainda que o nosso estudo *in vivo* tenha demonstrado que UMN-1001 e 1 foram tóxicos na dose utilizada, o composto UMN-1002 não apresentou toxicidade e reduziu significativamente a carga do ZIKV nos tecidos cerebrais e oculares dos animais. Esses resultados indicam que essa molécula consegue alcançar o sistema nervoso central, ser ativado nesses sítios devido à expressão ubíqua de Hint1 em virtualmente todos os tecidos, e atinge concentrações efetivas nesses tecidos. Estudos para investigar a toxicidade de UMN-1001 e 1 *in vivo* serão realizados pelo nosso grupo, onde iremos determinar os valores de DL₅₀ e realizar estudos de farmacocinética.

Coletivamente, os resultados obtidos para UMN-1001 e UMN-1002 nos confirmam o sucesso da aplicação da abordagem de pró-nucleotídeos gerando compostos com importante atividade antiviral e baixa toxicidade celular associada. O sucesso da abordagem dos ProTides também foi confirmado pelos resultados do UMN-1002 no modelo animal utilizado. Além disso, o grupamento 2-(metiltio)etil incorporado na molécula do UMN-1002 pode ser utilizado para modificar moléculas de diferentes análogos de nucleosídeo dando a esses compostos um método eficiente não enzimático alternativo para a liberação intracelular de compostos monofosforilados.

Os dados obtidos com o 4Ei-11 para ZIKV, nos mostram que esse vírus depende, em algum nível, da via dependente de cap para a síntese das suas proteínas, uma vez que o antagonismo de eIF4E reduziu significativamente a quantidade de partículas virais infecciosas liberadas pelas células SH-Sy5y infectadas, além de ter revertido o dano à viabilidade dessas células e das células HEK 293 causado pela infecção. Experimentos adicionais para demonstrar os níveis de eIF4E durante a infecção e tratamento, investigar se o vírus utiliza uma via alternativa para síntese de suas proteínas e determinar o valor de EC₅₀ desse composto contra ZIKV serão realizados futuramente.

A inibição da iniciação da tradução via cap-dependente impactou, de maneira mais relevante, a infecção pelo SARS-CoV-2, uma vez que o tratamento das células Calu-3 com 4Ei-10 e 4Ei-11 inibiu completamente a quantidade de partículas virais infecciosas liberadas em 48 horas pós-infecção, indicando a importância dessa via para o sucesso da infecção. Experimentos adicionais para demonstrar o mecanismo de ação e os parâmetros farmacológicos estão sendo realizados pelo nosso grupo.

Assim como os compostos UMN-1001 e UMN-1002, 4Ei-10 e 4Ei-11 são pró-nucleotídeos análogos de guanósina e necessitam da atividade hidrolase de Hint1 para metabolização intracelular e liberação do metabólito que será di e tri-fosforilado gerando a forma farmacologicamente ativa. O sucesso no controle das infecções por ZIKV e SARS-CoV-2 por esses compostos, confirma o sucesso da estratégia de incorporação de um sítio na molécula, grupamento fosforamidato, que a torna alvo para a ativação enzimática mediada por uma enzima que está

presente em virtualmente todos os tecidos, visto o sucesso de UMN-1002 nos tecidos do sistema nervoso central e a atividade antiviral observada em células de diferentes tecidos.

Os resultados obtidos com Efavirenz nos mostram o potencial desse fármaco para o controle da infecção por SARS-CoV-2. O tratamento com EFV conseguiu reduzir significativamente a replicação de isolados pertencentes a diferentes linhagens virais de importância epidemiológica em células relevantes à patogênese da infecção por SARS-CoV-2 como células epiteliais de pulmão, hepáticas e monócitos humanos. Os parâmetros farmacológicos obtidos para o EFV, EC_{50} e índice de seletividade, foram superiores aos observados para outros fármacos que também demonstraram atividade contra o SARS-CoV-2. Quando comparado ao Redemsvir, único medicamento aprovado pelo FDA para o tratamento da COVID-19, o EFV apresenta EC_{50} 3 vezes menor e a vantagem de ser biodisponível quando administrado por via oral. Experimentos adicionais para a determinação do mecanismo de ação do EFV na infecção por SARS-CoV-2 estão sendo realizados pelo nosso grupo.

Após a realização desse trabalho, concluímos que obtivemos sucesso em demonstrar a atividade antiviral dos compostos testados. Estudos posteriores serão realizados para demonstrar a atividade *in vivo* do UMN-1002 contra DENV-2, para caracterização do mecanismo de ação dos ProTides antagonistas de eIF4E na infecção por ZIKV e SARS-CoV-2 e do EFV na infecção por SARS-CoV-2. Ainda que os dados clínicos de outros antirretrovirais sejam inconclusivos quanto ao benefício do seu uso na COVID-19, os resultados obtidos para o EFV nesse trabalho apontam que ele é válido para ser testado em modelos *in vivo* de infecção pelo SARS-CoV-2.

REFERÊNCIAS

- ABUSHOUK, A. I.; NEGIDA, A.; AHMED, H. An updated review of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 84, nov. 2016.
- AGUIRRE, S. et al. DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 10, 4 out. 2012.
- AHMAD, Z. et al. Repression of oncogenic cap-mediated translation by 4Ei-10 diminishes proliferation, enhances chemosensitivity and alters expression of malignancy-related proteins in mesothelioma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 85, n. 2, 23 fev. 2020.
- ALPUCHE-LAZCANO, S. et al. Higher Cytopathic Effects of a Zika Virus Brazilian Isolate from Bahia Compared to a Canadian-Imported Thai Strain. **Viruses**, v. 10, n. 2, 27 jan. 2018.
- ARAUJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 3, mar. 2016.
- BABUSIS, D. et al. Sofosbuvir and Ribavirin Liver Pharmacokinetics in Patients Infected with Hepatitis C Virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, maio 2018.
- BANERJEE, A. K. et al. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. **Cell**, v. 183, n. 5, nov. 2020.
- BARDAWEEL, S. K.; GHOSH, B.; WAGNER, C. R. Synthesis and evaluation of potential inhibitors of human and Escherichia coli histidine triad nucleotide binding proteins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 1, jan. 2012.
- BARDINA, S. V. et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. **Science**, v. 356, n. 6334, 14 abr. 2017.
- BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, n. 7, jul. 2016.
- BARROWS, N. J. et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 2, ago. 2016.
- BASTOS, M. M. et al. Efavirenz a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of first-generation: Approaches based on its medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, jan. 2016.
- BECK, B. R. et al. Predicting commercially available antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drug-target interaction deep learning model. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, 2020.
- BERNATCHEZ, J. A. et al. Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 2, 23 jan. 2020a.
- BERNATCHEZ, J. A. et al. Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 2, 23 jan. 2020b.

- BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, v. 2, n. 1, jan. 1988.
- BRASIL, M. D. S.-. **Dengue diagnóstico e manejo clínico criança**. [s.l: s.n.]. v. 3 edição
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, 15 dez. 2016.
- BRESSANELLI, S. et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 4, 25 fev. 2004.
- BRYAN-MARRUGO, O. L. et al. History and progress of antiviral drugs: From acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, jul. 2015.
- BULLARD-FEIBELMAN, K. M. et al. The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. **Antiviral Research**, v. 137, jan. 2017.
- BURKARD, C. et al. Coronavirus Cell Entry Occurs through the Endo-/Lysosomal Pathway in a Proteolysis-Dependent Manner. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 11, 6 nov. 2014.
- CAGNO, V. SARS-CoV-2 cellular tropism. **The Lancet Microbe**, v. 1, n. 1, maio 2020.
- CAHARD, D. Aryloxy Phosphoramidate Triesters as Pro-Tides. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 4, 2004.
- CANO-SOLDADO, P.; PASTOR-ANGLADA, M. Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 2, mar. 2012.
- CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, jun. 2014.
- CHANG, H.-H. et al. Systematic analysis of protein identity between Zika virus and other arthropod-borne viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 95, n. 7, 1 jul. 2017.
- CHEN, W. et al. Hepatitis C Virus Increases Free Fatty Acids Absorption and Promotes its Replication Via Down-Regulating GADD45 α Expression. **Medical Science Monitor**, v. 22, 6 jul. 2016.
- CHEN, Y. W.; YIU, C.-P. B.; WONG, K.-Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CLpro) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. **F1000Research**, v. 9, 9 abr. 2020.
- CHEN, Y.-L.; YOKOKAWA, F.; SHI, P.-Y. The search for nucleoside/nucleotide analog inhibitors of dengue virus. **Antiviral Research**, v. 122, out. 2015.
- CHERNYAK, B. V. et al. COVID-19 and Oxidative Stress. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 12–13, 28 dez. 2020.
- CHITALIA, V. C.; MUNAWAR, A. H. A painful lesson from the COVID-19 pandemic: the need for broad-spectrum, host-directed antivirals. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, 15 dez. 2020.

CHOY, K.-T. et al. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. **Antiviral Research**, v. 178, jun. 2020.

CLARKE, B. D. et al. Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. **Virus Research**, v. 206, ago. 2015.

COSTA, S. et al. Antileishmanial activity of antiretroviral drugs combined with miltefosine. **Parasitology Research**, v. 115, n. 10, 1 out. 2016.

DAVID J. BARTON; B. JOAN MORASCO; JAMES B. FLANEGAN*. Translating Ribosomes Inhibit Poliovirus Negative-Strand RNA Synthesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 12, p. 10104–10112, dez. 1999.

DE ALWIS, R. et al. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 19, 8 maio 2012.

DE CLERCQ, E. Milestones in the discovery of antiviral agents: nucleosides and nucleotides. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 6, dez. 2012.

DE CLERCQ, E.; LI, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, jul. 2016a.

DEORE, A. B. et al. The Stages of Drug Discovery and Development Process. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 7, n. 6, 15 dez. 2019.

DESTEFANO, J. J. Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Inhibit Reverse Transcriptase through a Mutually Exclusive Interaction with Divalent Cation–dNTP Complexes. **Biochemistry**, v. 58, n. 16, 23 abr. 2019.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, set. 1952.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, maio 2016.

DONG, Q. et al. Efavirenz induces autophagy and aberrant differentiation in normal human keratinocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 6, jun. 2013.

DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, 11 jun. 2009.

DUNCAN, R.; HERSHEY, J. W. Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 11, jun. 1983.

ECHAVARRIA-CONSUEGRA, L.; SMIT, J. M.; REGGIORI, F. Role of autophagy during the replication and pathogenesis of common mosquito-borne flavi- and alphaviruses. **Open Biology**, v. 9, n. 3, 13 mar. 2019.

EYER, L. et al. Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 5, 1 set. 2016.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: [s.l: s.n.].

FERNANDEZ-GARCIA, M.-D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, abr. 2009.

FERREIRA, A. C. et al. Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 25 dez. 2017.

FERREIRA, A. C. et al. SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, 19 jun. 2021.

FILOMATORI, C. V. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. **Genes & Development**, v. 20, n. 16, 15 ago. 2006.

FISCHL, M. A. et al. The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. **New England Journal of Medicine**, v. 317, n. 4, 23 jul. 1987.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, maio 2011.

GALMARINI, C.; MACKEY, J.; DUMONTET, C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. **Leukemia**, v. 15, n. 6, 5 jun. 2001.

GAO, Y. et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. **Science**, v. 368, n. 6492, 15 maio 2020.

GARCEZ, P. P. et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 23 fev. 2017.

GARCIA, G. et al. Antiviral drug screen identifies DNA-damage response inhibitor as potent blocker of SARS-CoV-2 replication. **Cell Reports**, v. 35, n. 1, abr. 2021.

GINGRAS, A.-C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, n. 1, jun. 1999.

GIRARD, M. et al. Arboviruses: A global public health threat. **Vaccine**, v. 38, n. 24, maio 2020.

GLOWACKA, I. et al. Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. **Journal of Virology**, v. 85, n. 9, 1 maio 2011.

GRITSUN, D. J. et al. Molecular Archaeology of Flaviviridae Untranslated Regions: Duplicated RNA Structures in the Replication Enhancer of Flaviviruses and Pestiviruses Emerged via Convergent Evolution. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 19 mar. 2014.

GURBEL, P. A. et al. Combination Antiplatelet and Oral Anticoagulant Therapy in Patients With Coronary and Peripheral Artery Disease. **Circulation**, v. 139, n. 18, 30 abr. 2019.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. S12, dez. 2010.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, 22 dez. 2016.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, jan. 2015.

HALSTEAD, S. B. Which Dengue Vaccine Approach Is the Most Promising, and Should We Be Concerned about Enhanced Disease after Vaccination? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 6, jun. 2018.

HALSTEAD, S. B.; RUSSELL, P. K. Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. **Vaccine**, v. 34, n. 14, mar. 2016.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015a.

HASHIMOTO, T. et al. Importation of Zika Virus from Vietnam to Japan, November 2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 7, jul. 2017.

HECHT, M. et al. Cytotoxic effect of Efavirenz in BxPC-3 pancreatic cancer cells is based on oxidative stress and is synergistic with ionizing radiation. **Oncology Letters**, 5 dez. 2017.

HINNEBUSCH, A. G. Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 3, set. 2011.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, abr. 2020.

HOLTZMAN, M.; GOLDEN, W. C.; SHEFFIELD, J. S. Zika Virus Infection in the Pregnant Woman. **Clinical Obstetrics & Gynecology**, v. 61, n. 1, mar. 2018.

HORBY, P. W. et al. Lopinavir–ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. **The Lancet**, v. 396, n. 10259, out. 2020.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, 6 mar. 2021.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, fev. 2020.

IRWIN, K. K. et al. Antiviral drug resistance as an adaptive process. **Virus Evolution**, v. 2, n. 1, 10 jan. 2016.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 2, fev. 2010.

JACOBSON, B. A. et al. 4Ei-10 interdiction of oncogenic cap-mediated translation as therapy for non-small cell lung cancer. **Investigational New Drugs**, v. 39, n. 3, 23 jun. 2021.

JORDHEIM, L. P. et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 6, 31 jun. 2013.

JOUBERT, P.-E. et al. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 5, 7 maio 2012.

KAPTEIN, S. J.; NEYTS, J. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 30, out. 2016.

KAUFMAN, H. E. Clinical Cure of Herpes Simplex Keratitis by 5-Iodo-2'-Deoxyuridine. **Experimental Biology and Medicine**, v. 109, n. 2, 1 fev. 1962.

KIERMAYR, S. et al. Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. **Journal of Virology**, v. 78, n. 15, ago. 2004.

KIM, D. et al. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**, v. 181, n. 4, maio 2020.

KING, N. J. C. et al. Immunopathology of flavivirus infections. **Immunology & Cell Biology**, v. 85, n. 1, 5 jan. 2007.

KODAMA, E. et al. Binding Modes of Two Novel Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, YM-215389 and YM-228855, to HIV Type-1 Reverse Transcriptase. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 19, n. 3, 1 jun. 2008.

KOKIC, G. et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 12 dez. 2021.

KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V.; MORRIS, T. J. Evolution and Taxonomy of Positive-Strand RNA Viruses: Implications of Comparative Analysis of Amino Acid Sequences. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 5, 26 jan. 1993.

KUMAR, N. et al. Host-Directed Antiviral Therapy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 17 jun. 2020a.

KUMAR, S. et al. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In: [s.l.: s.n.].

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, ago. 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, maio 2016.

LEE, E. et al. Structures of flavivirus RNA promoters suggest two binding modes with NS5 polymerase. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 5 dez. 2021.

LI, L. et al. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, 28 mar. 2008.

LI, S. et al. Treatment of Breast and Lung Cancer Cells with a N-7 Benzyl Guanosine Monophosphate Tryptamine Phosphoramidate Pronucleotide (4Ei-1) Results in Chemosensitization to Gemcitabine and Induced eIF4E Proteasomal Degradation. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, 4 fev. 2013.

LIMA, M. C. et al. The Transcriptional and Protein Profile From Human Infected Neuroprogenitor Cells Is Strongly Correlated to Zika Virus Microcephaly Cytokines Phenotype Evidencing a Persistent Inflammation in the CNS. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 16 ago. 2019.

LIN, Y.-C. et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, 3 dez. 2014.

LOU, Z.; SUN, Y.; RAO, Z. Current progress in antiviral strategies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, fev. 2014.

LUTZ, S.; LIU, L.; LIU, Y. Engineering Kinases to Phosphorylate Nucleoside Analogs for Antiviral and Cancer Therapy. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 63, n. 11, 27 nov. 2009.

MACKENZIE, J. Wrapping Things up about Virus RNA Replication. **Traffic**, v. 6, n. 11, nov. 2005.

MACKENZIE, J. M.; WESTAWAY, E. G. Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear To Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, 15 nov. 2001.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, v. 10, n. S12, 30 dez. 2004.

MAMANE, Y. et al. mTOR, translation initiation and cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 48, 16 out. 2006.

MANOKARAN, G. et al. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. **Science**, v. 350, n. 6257, 9 out. 2015.

MARIMA, R. et al. Efavirenz induces DNA damage response pathway in lung cancer. **Oncotarget**, v. 11, n. 41, 13 out. 2020.

MARTINEZ, F. O. et al. Monocyte activation in systemic Covid-19 infection: Assay and rationale. **EBioMedicine**, v. 59, set. 2020.

MATOS DE SOUZA, M. R. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Characterization of the Anti-Zika Virus Activity of ProTides of 2'-C- β -Methylguanosine. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, 10 jul. 2020.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, fev. 2017.

MCGUIGAN, C. et al. Phosphoramidate ProTides of 2'-C-Methylguanosine as Highly Potent Inhibitors of Hepatitis C Virus. Study of Their *In Vitro* and *In Vivo* Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 13, 8 jul. 2010.

MCMAHON, R.; ZABOROWSKA, I.; WALSH, D. Noncytotoxic Inhibition of Viral Infection through eIF4F-Independent Suppression of Translation by 4EGI-1. **Journal of Virology**, v. 85, n. 2, 15 jan. 2011.

- MEHTA, P. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, mar. 2020.
- MERCORELLI, B.; PALÙ, G.; LOREGIAN, A. Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 10, out. 2018.
- MESCI, P. et al. Blocking Zika virus vertical transmission. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 19 dez. 2018.
- MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, mar. 2014.
- MIGLIACCIO, G. et al. Characterization of Resistance to Non-obligate Chain-terminating Ribonucleoside Analogs That Inhibit Hepatitis C Virus Replication in Vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, dez. 2003.
- MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, jan. 2004.
- MOERKE, N. J. et al. Small-Molecule Inhibition of the Interaction between the Translation Initiation Factors eIF4E and eIF4G. **Cell**, v. 128, n. 2, jan. 2007.
- MUMTAZ, N. et al. Cell-line dependent antiviral activity of sofosbuvir against Zika virus. **Antiviral Research**, v. 146, out. 2017.
- MURAKAMI, E. et al. Mechanism of Activation of PSI-7851 and Its Diastereoisomer PSI-7977. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, nov. 2010.
- NAKAGAWA, K.; LOKUGAMAGE, K. G.; MAKINO, S. Viral and Cellular mRNA Translation in Coronavirus-Infected Cells. In: [s.l: s.n.].
- NAYAK, S. et al. Pathogenesis and Molecular Mechanisms of Zika Virus. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 34, n. 05, 9 set. 2016.
- NEM DE OLIVEIRA SOUZA, I. et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 444, 6 jun. 2018.
- NG, I. H. W. et al. Zika Virus NS5 Forms Supramolecular Nuclear Bodies That Sequester Importin- α and Modulate the Host Immune and Pro-Inflammatory Response in Neuronal Cells. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, 14 jun. 2019.
- NG, K. K.-S.; ARNOLD, J. J.; CAMERON, C. E. Structure-Function Relationships Among RNA-Dependent RNA Polymerases. In: [s.l: s.n.].
- NGUEYEN, T. T. N. et al. Zika Virus Proteins NS2A and NS4A Are Major Antagonists that Reduce IFN-I Promoter Activity Induced by the MDA5/RIG-I Signaling Pathway. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 10, 28 out. 2019.
- OCHS, K. et al. Interaction of Translation Initiation Factor eIF4B with the Poliovirus Internal Ribosome Entry Site. **Journal of Virology**, v. 76, n. 5, mar. 2002.

OKON, A. et al. Anchimerically Activatable Antiviral ProTides. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 9, 14 set. 2017a.

OKON, A. et al. Anchimerically Activated ProTides as Inhibitors of Cap-Dependent Translation and Inducers of Chemosensitization in Mantle Cell Lymphoma. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 19, 12 out. 2017b.

OTTO, G. A.; PUGLISI, J. D. The Pathway of HCV IRES-Mediated Translation Initiation. **Cell**, v. 119, n. 3, out. 2004.

PAUL, D.; BARTENSCHLAGER, R. Flaviviridae Replication Organelles: Oh, What a Tangled Web We Weave. **Annual Review of Virology**, v. 2, n. 1, 9 nov. 2015.

PERTUSAT, F.; SERPI, M.; MCGUIGAN, C. Medicinal Chemistry of Nucleoside Phosphonate Prodrugs for Antiviral Therapy. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 22, n. 5, 1 abr. 2012.

PETROV, A. M. et al. CYP46A1 Activation by Efavirenz Leads to Behavioral Improvement without Significant Changes in Amyloid Plaque Load in the Brain of 5XFAD Mice. **Neurotherapeutics**, v. 16, n. 3, 6 jul. 2019.

PETTERSSON, J. H.-O. et al. How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? **mBio**, v. 7, n. 5, 2 nov. 2016.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, 4 jun. 2020.

POSSAS, C. Zika: what we do and do not know based on the experiences of Brazil. **Epidemiology and Health**, v. 38, 31 maio 2016.

PURNELL, P. R.; FOX, H. S. Efavirenz Induces Neuronal Autophagy and Mitochondrial Alterations. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 351, n. 2, nov. 2014.
RAMOS-CASALS, M.; BRITO-ZERON, P.; MARIETTE, X. Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, n. 6, 26 jun. 2021.

RASTOGI, M. et al. SARS coronavirus 2: from genome to infectome. **Respiratory Research**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2020.

RAUTIO, J. et al. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 3, mar. 2008.

Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 6, 11 fev. 2021.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. In: [s.l.: s.n.].

RIEDL, W. et al. Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I and MDA5-Mediated Innate Immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 26, n. 4, out. 2019.

RIVA, L. et al. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. **Nature**, v. 586, n. 7827, 1 out. 2020.

ROBINSON, M. L.; DURBIN, A. P. Dengue vaccines. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 5, out. 2017.

RODRIGUES, T. S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, 1 mar. 2021.

ROSS, T. M. Dengue Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, mar. 2010.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, 15 ago. 2011.

RUBIN, D. et al. FDA Approval of Remdesivir — A Step in the Right Direction. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 27, 31 dez. 2020.

SACRAMENTO, C. Q. et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 30 mar. 2017.

SANFORD, T. J. et al. Circularization of flavivirus genomic RNA inhibits de novo translation initiation. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 18, 10 out. 2019.

SAWICKI, S. G.; SAWICKI, D. L.; SIDDELL, S. G. A Contemporary View of Coronavirus Transcription. **Journal of Virology**, v. 81, n. 1, jan. 2007.

SEKIYAMA, N. et al. Molecular mechanism of the dual activity of 4EGI-1: Dissociating eIF4G from eIF4E but stabilizing the binding of unphosphorylated 4E-BP1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 30, 28 jul. 2015.

SHAW, G. et al. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 8, 10 jun. 2002.

SHIVAYA VALASEK, L. ‘Ribozoomin’ – Translation Initiation from the Perspective of the Ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs). **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, n. 4, 1 jul. 2012.

SHOJAEI, S. et al. Autophagy and SARS-CoV-2 infection: A possible smart targeting of the autophagy pathway. **Virulence**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2020.

SIEMIENIUK, R. A. et al. Drug treatments for covid-19: living systematic review and network meta-analysis. **BMJ**, 30 jul. 2020.

SILVERA, D.; FORMENTI, S. C.; SCHNEIDER, R. J. Translational control in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 4, abr. 2010.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_10, 16 dez. 2017.

SIZUN, G. et al. Design, synthesis and antiviral evaluation of 2'- C -methyl branched guanosine pronucleotides: the discovery of IDX184, a potent liver-targeted HCV polymerase inhibitor. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 13, set. 2015.

- SLUSARCZYK, M.; SERPI, M.; PERTUSATI, F. Phosphoramidates and phosphonamidates (ProTides) with antiviral activity. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 26, 23 jan. 2018.
- SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. **Cell**, v. 136, n. 4, fev. 2009.
- SONG, Y. et al. Dengue and Zika Virus 5' Untranslated Regions Harbor Internal Ribosomal Entry Site Functions. **mBio**, v. 10, n. 2, 30 abr. 2019a.
- STEIN, D. S.; MOORE, K. H. P. Phosphorylation of Nucleoside Analog Antiretrovirals: A Review for Clinicians. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 1, jan. 2001.
- STRANGE, D. P. et al. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. **mBio**, v. 10, n. 4, 27 ago. 2019.
- SU, S. et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 6, jun. 2016.
- SUWANMANEE, S.; LUPLERTLOP, N. Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these Aedes mosquito-vectorized arboviruses. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, 26 fev. 2017.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Innate immunity to virus infection. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, jan. 2009.
- TASSANEETRITHEP, B. et al. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 7, 7 abr. 2003.
- THUMMA, S. C.; KRATZKE, R. A. Translational control: A target for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 258, n. 1, dez. 2007.
- TIAN, Y.-S. et al. Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 66, n. 3, 2018.
- TRIPATHI, S. et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 3, 9 mar. 2017.
- VALADÃO, A. L. C.; AGUIAR, R. S.; DE ARRUDA, L. B. Interplay between Inflammation and Cellular Stress Triggered by Flaviviridae Viruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 25 ago. 2016.
- VERNACHIO, J. H. et al. INX-08189, a Phosphoramidate Prodrug of 6- O -Methyl-2'- C -Methyl Guanosine, Is a Potent Inhibitor of Hepatitis C Virus Replication with Excellent Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, maio 2011.
- V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, 28 mar. 2021a.
- VOLOCH, C. M. et al. Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Lineage from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v. 95, n. 10, 26 abr. 2021.

WAGNER, C. R.; IYER, V. V.; MCINTEE, E. J. Pronucleotides: Toward their in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, n. 6, nov. 2000.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, abr. 2020.

WALSH, D.; MOHR, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, 17 dez. 2011.

WANG, C. et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, fev. 2020a.

WANG, J.-N.; LING, F. Zika Virus Infection and Microcephaly: Evidence for a Causal Link. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 10, 20 out. 2016.

WANG, M.-Y. et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 25 nov. 2020b.

WANG, Y. et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. **Journal of Hepatology**, v. 73, n. 4, out. 2020c.

WEISS, S. R.; LEIBOWITZ, J. L. Coronavirus Pathogenesis. In: [s.l: s.n.].

WESTAWAY, E. G.; MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. In: [s.l: s.n.].

WHO. **Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever**. [s.l: s.n.].

WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, jul. 2016.

WOO, P. C. Y. et al. Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, 15 jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. x, 147, 2009.

WU, C. et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, n. 7, 1 jul. 2020.

WU, J. et al. Available Evidence of Association between Zika Virus and Microcephaly. **Chinese Medical Journal**, v. 129, n. 19, 5 out. 2016.

XIA, S. et al. The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 12 dez. 2020.

XU, H.-T. et al. Evaluation of Sofosbuvir (β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 24 dez. 2017.

YAN, K. et al. Simple rapid in vitro screening method for SARS-CoV-2 anti-virals that identifies potential cytotoxicity-associated false positives. **Virology Journal**, v. 18, n. 1, 9 dez. 2021.

YATES, M. K.; SELEY-RADTKE, K. L. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. **Antiviral Research**, v. 162, fev. 2019.

YU, I.-M. et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, 28 mar. 2008.

YU, M.; LEVINE, S. J. Toll-like receptor 3, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: Key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 2, abr. 2011.

ZHANG, Y. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 11, 1 jun. 2003.

ZHENG, Y. et al. Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 18, 14 set. 2018.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, 20 fev. 2020.

ZMURKO, J. et al. The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, 10 maio 2016.

ANEXO I

FULL TEXT LINKS



ACS Med Chem Lett. 2017 Aug 14;8(9):958-962. doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00277.
eCollection 2017 Sep 14.

Anchimerically Activatable Antiviral ProTides

Aniekan Okon ¹, Marcos Romário Matos de Souza ², Rachit Shah ¹, Raquel Amorim ²,
Luciana Jesus da Costa ², Carston R Wagner ¹

Affiliations

PMID: 28947944 PMCID: PMC5601376 DOI: 10.1021/acsmedchemlett.7b00277

[Free PMC article](#)

Abstract

This work describes the synthesis and biological evaluation of an anchimerically activated proTide of 2'-C-β-methylguanosine as an inhibitor of dengue virus 2 (DENV-2). The proTide incorporates a chemically cleavable 2-(methylthio)ethyl moiety and a HINT1 hydrolyzable tryptamine phosphoramidate. Inhibition of DENV-2 replication by proTide **6** was 5-fold greater than the parent nucleoside while displaying no apparent cytotoxicity. Furthermore, we demonstrate with a HINT1 inhibitor that the anti DENV-2 activity of the proTide correlates with the activity of HINT1. Taken together, these results demonstrate that a phosphoramidate based pronucleotide that undergoes an initial nonenzymatic activation step based on anchimeric assistance followed by P-N bond cleavage by HINT1 can be prepared.

Keywords: Dengue virus; Phosphoramidate; antiviral; pronucleotide.

Figures

FOLLOW NCBI



Follow NLM

National Library of
Medicine
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894

Copyright
FOIA
Privacy

Help
Accessibility
Careers

NLM NIH HHS USA.gov

ANEXO II

FULL TEXT LINKS



ACS Infect Dis. 2020 Jul 10;6(7):1650-1658. doi: 10.1021/acsinfectdis.0c00091.
Epub 2020 Jun 19.

***In Vitro* and *In Vivo* Characterization of the Anti-Zika Virus Activity of ProTides of 2'-C-β-Methylguanosine**

Marcos Romário Matos de Souza, Marcela Sabino Cunha, Aniekan Okon ¹,
Fábio Luís Lima Monteiro, Loraine Campanati, Carston R Wagner ¹, Luciana Jesus da Costa

Affiliations

PMID: 32525653 DOI: [10.1021/acsinfectdis.0c00091](https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00091)

Abstract

The ProTide approach has emerged as a powerful tool to improve the intracellular delivery of nucleotide analogs with antiviral and anticancer activity. Here, we characterized the anti-ZIKV (ZIKV, Zika virus) activity of two ProTides of 2'-C-β-methylguanosine. ProTide **UMN-1001** is a 2'-C-β-methylguanosine tryptamine phosphoramidate monoester, and ProTide **UMN-1002** is a 2-(methylthio)-ethyl-2'-C-β-methylguanosine tryptamine phosphoramidate diester. **UMN-1002** undergoes stepwise intracellular activation to the corresponding nucleotide monophosphate followed by P-N bond cleavage by intracellular histidine triad nucleotide binding protein 1 (Hint1). **UMN-1001** is activated by Hint1 but is less cell-permeable than **UMN-1002**. **UMN-1001** and **UMN-1002** were found to be more potent than 2'-C-β-methylguanosine against ZIKV in human-derived microvascular endothelial and neuroblastoma cells and in reducing ZIKV RNA replication. Studies with a newborn mouse model of ZIKV infection demonstrated that, while treatment with 2'-C-β-methylguanosine and **UMN-1001** was lethal, treatment with **UMN-1002** was nontoxic and significantly reduced ZIKV infection. Our data suggests that anchimeric activated ProTides of 2'-C-β-methyl nucleosides should be further investigated for their potential as anti-ZIKV therapeutics.

Keywords: ProTides; Zika virus; antiviral treatment; nucleoside analogs; prodrugs.

FOLLOW NCBI



Follow NLM

National Library of
Medicine
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894

Copyright
FOIA
Privacy

Help
Accessibility
Careers

NLM NIH HHS USA.gov