



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

LUCILENE WILDNER GRANELLA

**Evolução de *Zika virus* durante o tratamento com ivermectina**

FLORIANÓPOLIS  
2020

Lucilene Wildner Granella

**Evolução de *Zika virus* durante o tratamento com ivermectina**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. Daniel S. Mansur

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Granella, Lucilene Wildner

Evolução de Zika virus durante o tratamento com ivermectina / Lucilene Wildner Granella ; orientador, Daniel Santos Mansur, 2020.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Zika virus. 3. ivermectina. 4. quasispécies. 5. resistência. I. Mansur, Daniel Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. III. Título.

Lucilene Wildner Granella

### **Evolução de Zika virus durante o tratamento com ivermectina**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Prof, Ricardo Castilho Garcez Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Fernando Spiller Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Patricia Hermes Stoco Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Alfeu Zanotto Filho Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

---

Prof. Rui Daniel Prediger, Dr.  
Coordenador do Programa

---

Prof. Daniel Santos Mansur, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho a minha mãe e irmão por serem meus alicerces e ao meu tio Benicio (in memoriam).

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela minha vida, família e amigos e por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Santos Mansur, por ter aceitado o desafio de orientar uma aluna sem nenhuma experiência com pesquisa. Obrigada pelos incentivos; pela confiança, conselhos, dedicação e, sobretudo por todos os ensinamentos profissionais e condução deste trabalho.

Aos professores André Báfica, Fernando Spiller e José Henrique M. Oliveira pelas discussões científicas.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Ricardo Garcez, Dr. Fernando Spiller, Dra Patricia Hermes Stoco, Dr. Alfeu Zanotto Filho e Dr. Mario Steindel, o meu muito obrigado pela leitura e colaboração para a finalização desse trabalho.

A minha mãe que sempre me ensinou a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir mesmo se parecesse impossível. Obrigada por todas as vezes que você renunciou a sua vida para cuidar de mim e me ajudar. Obrigada por ser pai e mãe, por estar sempre ao meu lado, por todas as conversas, puxões de orelha e por todo o carinho. Obrigada por ser meu anjo da guarda, por ser essa mulher incrível e por ser meu maior exemplo, quem dera um dia eu seja um terço do que você é. Mãe, sem você eu nunca teria chegado até aqui. Se sou o que sou hoje, eu devo tudo a você. Quem dera por um descuido Deus te fizesse eterna!

Ao meu irmão por todo apoio e companheirismo.

A Taissa Ricciardi Jorge, me faltam palavras para agradecer tudo o que fez em tão pouco tempo por mim. Sou inteiramente grata por todos os ensinamentos, paciência, compreensão e a parceria. Obrigada pelos conselhos, pelas aulas, pelo apoio e pelas ideias para concretização desse trabalho. Obrigada pelo crescimento profissional e pessoal que você me proporcionou durante esse tempo. Com toda certeza você desempenhou um papel muito importante para a realização deste trabalho.

Ao Daniel Patricio que me apresentou o laboratório e o Prof. Dr. Daniel Santos Mansur. Também foi meu mentor nos primeiros meses no laboratório, me ensinando desde as coisas mais básicas como pipetar, cultura celular e com algumas mais complexas como citometria de fluxo. Muito obrigada por toda ajuda e pelas discussões científicas. Também agradeço pela amizade e pelo apoio nesses dois anos.

A Constanza Espada por ter me auxiliado com as padronizações problemáticas da Ivermectina, células e vírus. Por ter acreditado em mim, quando nem eu mesma acreditava. Muito obrigada por todas as conversas e por toda paciência.

A Yonne K. T. de Menezes por ter sido minha tutora durante o tempo que passei trabalhando com Mtb, pelas madrugadas de experimento no HU, pela amizade, pelas risadas e histórias. Sempre vou lembrar que “o lysoform tem que fazer espuminha” e que em virtude disso você quase perdeu um experimento importante.

A todos os integrantes do LiDI pelas conversas de corredor, churrascos, festas juninas, bolos, brincadeiras, discussões científicas e por todo o apoio que recebi de vocês. Muito obrigada por fazerem os meus dias mais alegres.

A Ana Luiza Abdalla dos Santos, que além de colega de apartamento se tornou uma irmã. Agradeço pela ajuda nos experimentos, pela discussão dos resultados e mais ainda por todos os colos e conselhos nos momentos que eu mais precisei. Obrigada também por todas as festas e momentos de diversão. Você tem um lugar especial no meu coração.

A Ana Merian da Silva e Denise Damo por aturarem minhas crises de ansiedade e estresse, pelas risadas, preocupações, companheirismo e amizade. Vocês além de colegas de apartamento são minha segunda família. Ana Merian muito obrigada por não ter me deixado passar fome durante o período que estava escrevendo a dissertação.

Aos meus queridos amigos Rafael Cesar, Patrick Remus Suman, Pamela Schena e Jéssica Mara Birkheuer por toda força, palavras de apoio, pelas conversas, pela amizade e carinho. Também a todos os outros não citados aqui, muito obrigada pelas conversas, festas, bebedeiras e todos os momentos de distração, sem vocês minha vida em Florianópolis não seria a mesma.

A pós graduação de farmacologia e os docentes que contribuíram para minha formação.

Ao LAMEB e ao Laboratório de Protozoologia pela disponibilização de equipamentos.

As agências de fomento CNPQ e CAPES pelo financiamento de pesquisa e bolsa.

Ao Venvanse® e ao Deller®, sem vocês minha vida não é a mesma!

*“Everything happens for a reason, even if you do not know the reason now, you will soon enough, just give it some time.”*  
**Unknown Author.**

## RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV) é um vírus de RNA, membro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* sp. As recentes epidemias causadas pelo ZIKV geraram sérios problemas de saúde pública por todo o mundo por causar complicações neurológicas graves em adultos e crianças. Atualmente não existem vacinas preventivas ou fármacos anti-ZIKV licenciados. Como a busca por drogas antivirais é alta, redirecionar medicamentos previamente aprovados é um caminho mais rápido. Um exemplo disso é a ivermectina (IVM), que está em estudo clínico com humanos para tratar infecções causadas por DENV e se mostra promissora também para tratar infecções com ZIKV. Entretanto os vírus de RNA podem apresentar resistência as drogas antivirais por apresentarem uma ampla variabilidade genética (quasispécies), devido à alta taxa de mutação intrínseca associada à polimerase (RdRp) viral. Diante disso, o presente trabalho objetivou induzir o ZIKV (cepa BR15261) a adquirir resistência a IVM. Para tal propomos um protocolo de evolução viral em células A549 e C6/36 que simule pressões de seleção suficientes para prever mutações no genoma do vírus, que possam levar a falha do tratamento a longo prazo. Para realização deste protocolo as células A549 foram tratadas com 10  $\mu$ M de IVM e seu respectivo veículo por 4h seguidas da infecção com MOI 0,3 de ZIKV. Já as passagens em C6/36 foram realizadas por 84 horas na ausência da droga. Os resultados demonstraram que essa concentração da droga não apresentou efeitos citotóxicos consideráveis e diminuiu o título viral de ZIKV frente ao pré-tratamento das células. Também foram observadas modificações fenotípicas do vírus a partir das passagens três (p3), como alteração no tamanho da placa de lise e queda no título viral. Os resultados aqui apresentados sugerem que o *fitness* viral possa ter sofrido alterações já nas primeiras passagens e que na p5b tenha ocorrido a perda das quasispécies com maior *fitness* da população. Por consequência, os títulos decrescentes observados até a p7a seriam em função da adaptação das quasispécies de menor *fitness*. No entanto ainda não é possível afirmar que os vírus tenham adquirido resistência à IVM. Por isso é necessário que mais passagens sejam realizadas, bem como o sequenciamento genômico para análise da evolução das quasispécies na população. Todavia o protocolo de passagens virais aqui padronizado e demais dados do uso da IVM em nosso sistema será útil para a realização de novos ensaios que visem explorar o uso da IVM como tratamento para ZIKV e/ou outros *Flavivirus*.

**Palavras-chave:** *Zika virus*; ivermectina; resistência; quasispécies; *fitness*.

## ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an RNA virus, member of the *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus, transmitted by *Aedes* sp. The recent epidemics caused by ZIKV have caused severe neurological complications in adults and children creating public health concerns around the world. Currently, there is no licensed vaccine to prevent or drugs available to treat ZIKV infections. As the search for antiviral drugs is urgent, the repurpose of approved drugs is a quicker route to provide an option of treatment. One example is ivermectin (IVM), an antiparasitic drug currently on a clinical study to treat DENV infections and with promising results pointing its use also for ZIKV infections. However, RNA viruses can be resistant to antiviral drugs because their wide genetic variability (quasispecies) caused by the high rate of intrinsic mutation associated to the viral polymerase (RdRp). Therefore, this study aimed to induce ZIKV (strain BR15261) to acquire resistance to IVM. To this end, we proposed a protocol for viral evolution by alternating passages in A549 and C6/36 cells. This protocol simulates selection pressures to predict mutations in the virus genome that could lead to failure in the long-term usage of this drug. In the protocol, A549 cells were treated with 10  $\mu$ M of IVM or vehicle for 4 hours followed by infection with ZIKV at MOI 0.3. Passages on C6/36 cells, on the other hand, were performed for 84h in the absence of the drug. The results have shown limited cytotoxicity of IVM in cells and confirmed its viral activity against ZIKV. Changes in the virus phenotype, such as a decrease of plaque size and viral titers were also observed from the third passage (p3). These results suggest that viral fitness may have undergone changes and from p5b the loss of quasispecies with greater fitness within the population has occurred. By consequence, the adaptation of lesser fitness quasispecies would explain the decreasing titers observed up to p7a. However, up to this point, it is not yet possible to say that viruses have acquired resistance to IVM. To do so it is necessary to perform more passages, as well as genomic sequencing to analyze the evolution of quasispecies within the population. Nonetheless, the viral passages protocol here developed and described as well as all data on the use of IVM in our system will be useful to carry out new tests aiming to further explore the use of IVM as a treatment for ZIKV and/or other Flaviviruses.

**Keywords:** *Zika virus*; ivermectin; resistance; quasispecies; *fitness*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização genômica e estrutura do ZIKV. ....	26
Figura 2. Tráfico núcleo-citoplasmático da NS5. ....	28
Figura 3. Ciclo replicativo do ZIKV. ....	30
Figura 4. Estrutura química da Ivermectina. ....	35
Figura 5. Descrição esquemática de uma população de quasispécie viral. ....	38
Figura 6. Estratégias de gates para análises de citometria de fluxo. ....	46
Figura 7. Esquemas representativos do protocolo de múltiplas passagens de ZIKV. .....	49
Figura 8. Determinação da MOI e tempo de infecção do ZIKV em células A549. ....	50
Figura 9. Citotoxicidade da IVM em células A549. ....	52
Figura 10. Efeitos antivirais da IVM 10 $\mu$ M durante o pré-tratamento. ....	54
Figura 11. Evolução do título de ZIKV durante passagens seriadas em células A549 pré-tratadas com IVM. ....	57
Figura 12. Evolução do título de ZIKV durante passagens seriadas em células C6/36. .....	58
Figura 13. Imagens representativas das placas de lise formadas durante a titulação das passagens seriadas de ZIKV. ....	60
Figura 14. Efeito antiviral da IVM pós-infecção. ....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da viabilidade celular. ....	82
Tabela 2. Valores da viabilidade celular das células A549 após 24h de tratamento com Ivermectina pela técnica de MTT. ....	83
Tabela 3. Valores de MOI utilizados durante o processo de indução de mutação de ZIKV. ....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
>	Maior que
<	Menor que
°C	Graus centígrados
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
4G2	Anticorpo monoclonal (IgG) para marcação específica da proteína
A	Alanina
aa	Aminoácidos
aNLS	Sequência de localização nuclear alfa
ANOVA	Análise de variância
AXL	Receptor de tirosina quinase tipo AXL
bNLS	Sequência de localização nuclear beta
C	Proteína do capsídeo
CC50	Concentração Citolóxica de 50%
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CMC	Carboximetilcelulose
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
C-terminal	Carboxi-terminal
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
DC-SIGN	Receptor de Lectina tipo C
DENV	Dengue virus
DMEM F-12	Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture f-12
DMNT	Dose máxima não tóxica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
E	Proteína do Envelope
ELISA	Ensaio imunossorvente celular ligado a enzima
EXP	Exportina

FACS	Citometria de fluxo (do inglês, <i>Flow Cytometry</i> )
FDA	(do inglês, Food and Drug Administration)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersão frontal de luz – tamanho (do inglês, <i>Forward Scatter Channel</i> )
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M	Ácido sulfúrico 2 molar
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
hpi	Horas pós infecção
HRP	Peroxidase de rábano silvestre
IC50	Concentração Inibitória de 50%
IFN-I	Interferon do tipo I
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
IMP	Importina
IMP $\alpha$	Homodímeros de importinas alfa
IMP $\alpha/\beta$ 1	Heterodímero de importinas alfa / beta 1
IMP $\beta$ 1	Homodímeros de importinas beta 1
IVM	Ivermectina
JEV	Japanese encephalitis virus
K	Lisina
kD	Quilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
L15	Leibovitz's I-15 medium
LCMV	Vírus da coriomeningite linfocitária
M	Proteína de Membrana
Mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Millimolar
<i>Mock</i>	Controle Negativo do Experimento – Células não infectadas
MOI	Multiplicidade de infecção.
MTase	Metiltransferase

MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-Brometo de difeniltetrazólio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NES	Sequência de exportação nuclear
NLS	Sinais de localização nuclear
nm	Nanômetros
NPC	Complexo de poros nucleares
NR	Vermelho neutro (do inglês, <i>neutrallred</i> )
NS	Proteína não estrutural
nt	Nucleotídeos
NT	Células não tratadas
N-terminal	Amino-terminal
NTPase	Nucleosídeo 5' trifosfatase estimulada por RNA
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Sequência aberta de leitura (do inglês, <i>Open Reading Frame</i> )
P/S	Solução de antibiótico penicilina/ estreptomicina
p1-7a	Passagem de ZIKV em células A549
p1-6b	Passagem de ZIKV em células C6/36
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	Proteínas estruturais
PFA	Paraformaldeído
PFU	Unidades Formadoras de Placa (do inglês, <i>Plaque Forming Unit</i> )
prM	Proteína precursora de membrana
RdRP	RNA polimerase dependente de RNA (do inglês <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> ).
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> )
Rtpase	RNA 5' trifosfatase
SBN	Sobrenadante
SCZ	Síndrome Congênita do ZIKV
SEM	Erro padrão da média
SFB	Soro fetal bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré

SSC	Dispersão lateral de luz – complexidade (do inglês, <i>Side Scatter Channel</i> )
ssRNA (+)	RNA de sentido positivo
STAT2	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 2 (do inglês, <i>Signal transducer and activator of transcription 2</i> )
TA	Temperatura ambiente
TAM	Constituinte da família de receptores tirosina quinase
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>
TIM	Constituinte da família de receptores da fosfatidilserina
TMB	Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina
Tyro3	Receptor de tirosina quinase 3
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USA	Estados Unidos da América (do inglês, <i>United States of America</i> )
UTR	Região não codificante (do inglês, <i>Untranslated Regions</i> )
V	Culturas pré tratadas com veículo
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
VFA	Vírus da febre aftosa
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1	OBJETIVOS .....	21
1.1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>21</b>
1.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1	ZIKA VIRUS .....	22
2.1.1	<b>História e epidemiologia do ZIKV</b> .....	<b>22</b>
2.1.2	<b>Transmissão e patogênese</b> .....	<b>23</b>
2.1.3	<b>Estrutura e genoma viral</b> .....	<b>25</b>
2.1.4	<b>Replicação viral e resposta imune</b> .....	<b>29</b>
2.1.5	<b>Tratamento atual e perspectivas</b> .....	<b>32</b>
2.2	IVERMECTINA (IVM).....	34
2.3	TEORIA EVOLUTIVA DE QUASISPÉCIES VIRAIS.....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
3.1	CULTIVO CELULAR.....	41
3.2	ENSAIOS VIRAIS .....	42
3.2.1	<b>Preparação dos estoques virais</b> .....	<b>42</b>
3.2.2	<b>Infecção viral</b> .....	<b>42</b>
3.2.3	<b>Titulação viral por placas de lise</b> .....	<b>43</b>
3.3	IVERMECTINA .....	43
3.4	ELISA <i>IN SITU</i> (ENSAIO IMUNOABSORVENTE CELULAR <i>IN SITU</i> LIGADO A ENZIMA). 44	
3.5	CITOMETRIA DE FLUXO .....	44
3.6	MTT .....	46
3.7	VERMELHO NEUTRO.....	47
3.8	PROTOCOLO DE EVOLUÇÃO DE ZIKV DURANTE MÚLTIPLAS PASSAGENS EM CULTURA CELULAR .....	48
3.9	ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
4.1	CÉLULAS A549 INFECTADAS COM MOI 0,3 DE ZIKV DURANTE 36H NÃO CAUSA MORTE CELULAR .....	50

4.2	EFEITO CITOTÓXICO DA IVM EM CÉLULAS A549 OCORRE EM CONCENTRAÇÕES MAIORES DE 10mM .....	51
4.3	IVM TEM EFEITO ANTIVIRAL CONTRA ZIKV .....	52
4.4	SETE PASSAGENS SERIADAS DE ZIKV EM CULTURA DE CÉLULAS SÃO SUFICIENTES PARA QUE OCORRA UM DECRESCIMO DO TÍTULO VIRAL .....	54
4.5	PERFIL ANTIVIRAL DA IVM É POTENCIALIZADO DURANTE O TRATAMENTO PROLONGADO .....	60
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE A – Resultados da viabilidade celular .....</b>	<b>82</b>
	<b>APÊNDICE B – Resultados de viabilidade celular após 24h de tratamento com IVM</b>	<b>83</b>
	<b>APÊNDICE C – Valores de MOI utilizadas em cada passagem celular do processo de indução de mutação de ZIKV .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Zika *virus* (ZIKV) é um arbovírus (*arthropod borne virus* - transmitido por artrópodes) da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, a qual possui outros membros que causam ampla morbidade em todo o mundo, como o *Dengue virus* (DENV), *West Nile virus* (WNV), *Yellow fever virus* (YFV) e *Japanese encephalitis virus* (JEV) (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; NEUFELDT et al., 2018). Identificado inicialmente em 1947 como um membro de baixo risco, o ZIKV só foi caracterizado como uma ameaça para os humanos durante a epidemia nas Américas em 2015. Na ocasião, patologias neurológicas graves e incomuns, além do aumento da incidência da síndrome de Guillain-Barré, uma síndrome neurológica grave, foi relacionada com a infecção por ZIKV (STROTTMANN et al., 2019; ZANLUCA et al., 2015). Como muitos outros flavivírus, tem como vetor mosquitos do gênero *Aedes sp.*, embora relações sexuais entre humanos, também tenha sido identificada como uma forma de transmissão (GREGORY et al., 2017; PETERSEN et al., 2016).

ZIKV é um pequeno vírus de RNA (ácido ribonucleico) envelopado com capsídeo de simetria icosaédrica. Seu genoma é traduzido em uma poliproteína longa no citoplasma de células infectadas, a qual é clivada e processada por proteases hospedeiras ou virais em três proteínas estruturais (PE) - proteína de membrana (prM), proteína do envelope (E) e proteína do capsídeo (C) - e sete proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) em uma fase posterior (CHAMBERS et al., 1990; KNIPE; HOWLEY, 2013). As PE são essenciais para a formação da partícula viral ao passo que as proteínas NS são responsáveis pela replicação do RNA viral, auxiliam na montagem de sua estrutura e evasão da resposta imune do hospedeiro (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; BIDET; GARCIA-BLANCO, 2018; GREEN et al., 2014; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006).

Assim como em outros *Flavivirus*, a NS5 do ZIKV é a NS mais conservada. Ela desempenha funções de Metiltransferase (MTase), participando da formação do capeamento viral, e de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável pela síntese do RNA viral (WANG et al., 2017b; ZHAO et al., 2017). Embora a replicação dos flavivírus ocorra no citoplasma, a NS5 é encontrada no núcleo em sua forma fosforilada, enquanto que a parte não fosforilada fica abundantemente ligada a NS3 no citoplasma (BROOKS et al., 2002; FRASER et al., 2014; KAPOOR et al., 1995;

PRYOR et al., 2007; ZHANG et al., 2017). Trabalhos recentes demonstraram que isso ocorre devido aos sinais de localização nuclear (NLS) presentes na região interdomínio da NS5 e NS3, que são reconhecidos pelo heterodímero de importinas (IMP)  $\alpha/\beta$ <sup>1</sup> da célula hospedeira, carreando a NS5 para o núcleo celular (BROOKS et al., 2002; FRASER et al., 2014; KAPOOR et al., 1995; STRANGE et al., 2019; TAY et al., 2013; WAGSTAFF et al., 2012; ZHANG et al., 2017). Em consequência, a NS5 modula as respostas imunes mediadas por interferon na célula hospedeira, através da degradação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 2<sup>2</sup> (STAT2) pelo proteassoma (ZHAO et al., 2017).

Atualmente, não há terapia antiviral aprovada ou vacina preventiva disponível para uso clínico contra ZIKV (BARROWS et al., 2016; TAN et al., 2019). Porém estudos recentes demonstraram que além da capacidade antiparasitária para tratar escabiose, oncocercose, filariose linfática e malária (CAMPBELL, 2012; CHACCOUR et al., 2013; CRUMP; OMURA, 2011), a ivermectina (IVM) pode atuar como uma potente droga antiviral sobre arbovírus, incluindo DENV e ZIKV (BARROWS et al., 2016; DONG; KANG; DIMOPOULOS, 2019; FRASER et al., 2014; KOSYNA et al., 2015; LUNDBERG et al., 2013; TAY et al., 2013; WAGSTAFF et al., 2012; XU et al., 2018). Apesar do mecanismo de ação como droga antiparasitária já ser bem descrito (MOLINARI et al., 2009; ROHRER; ARENA, 1995), ainda não é totalmente claro a ação da IVM como antiviral. Contudo, estudos demonstraram que IVM é um potente inibidor da IMP  $\alpha/\beta$ 1 (WAGSTAFF et al., 2011), e que este é o transportador nuclear da NS5 viral (PRYOR et al., 2007). Sendo assim, é proposto que o mecanismo antiviral da IVM seja pela inibição da translocação da NS5 para o núcleo (TAY et al., 2013; WAGSTAFF et al., 2012). Em virtude disso, desde 2015 um ensaio clínico de fase II / III está sendo realizado na Tailândia, utilizando IVM para tratar pacientes infectados com DENV (CROCI et al., 2016; U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE., 2015).

Os Vírus de RNA podem apresentar resistência as drogas antivirais e isso é atribuído a altas taxas mutacionais, rápida cinética replicativa, população numerosa de partículas virais e grande diversidade genética (DOMINGO et al., 2005; LAURING;

---

<sup>1</sup> (IMP)  $\alpha/\beta$ 1: Proteínas responsável por fazer o transporte nucleocitoplasmático de moléculas grandes, com mais de 45kD, através dos complexos de poros nucleares (NPCs) envoltos no envelope nuclear.

<sup>2</sup> STAT2: Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 2, codificada pelo gene STAT2 que em respostas a citocinas é fosforilada por quinases formando homo- ou heterodímeros que são translocados para o núcleo para atuarem como ativadores de transcrição de genes estimulados por interferon (ISGs) que participam ativamente na resposta antiviral celular.

ANDINO, 2010; PADMANABHAN; DIXIT, 2015). As altas taxas mutacionais e a diversidade genética são características geradas pela baixa fidelidade das RdRps durante a replicação viral, resultando em uma população genômica heterogênea, denominadas quasispécies virais (DOMINGO et al., 2006; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; LAURING; ANDINO, 2010). Este termo é definido como uma coleção de variantes, intimamente relacionadas, cuja hipótese é de cooperar para produzir o fenótipo geral do vírus (KAUTZ; FORRESTER, 2018; KHOU; PARDIGON, 2017). Essa teoria adiciona que os fatores de seleção não favorecem apenas os poucos indivíduos mais adaptados da população, e sim toda ela, levando em conta todos indivíduos mutantes de uma quasispécie (DOMINGO et al., 1998; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012). Os flavivírus, assim como outros vírus com genoma de RNA, são classificados como quasispécies e fortes pressões seletivas, tais como respostas imunológicas do hospedeiro ou drogas, podem conduzir a sua evolução e adaptação (KHOU; PARDIGON, 2017). Em virtude disso, muito vem se discutindo sobre a relação da teoria de quasispécies e a variabilidade na resistência aos antivirais (DOMINGO, 1997; DOMINGO et al., 2006; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; SCHUSTER, 2015).

O objetivo desse trabalho é avaliar a capacidade de replicação, adaptação e as alterações fenotípicas geradas no ZIKV durante a passagem serial na cultura de células A549 (células epiteliais de adenocarcinoma alveolar humano - ATCC® CCL-185™) e de células C6/36 (células de *Aedes albopictus* - ATCC® CRL-1660™) tratadas com IVM, a fim de simular as pressões evolutivas e a capacidade adaptativa do ZIKV durante o tratamento de uma droga com efeito antiviral. Hipotetizamos que durante este protocolo as pressões seletivas induzirão o ZIKV a adquirir resistência a IVM.

A ausência de um tratamento específico para a infecção com ZIKV, torna extremamente importante caracterizar alterações que possam ocorrer no vírus durante o tratamento com uma droga que está em estudo clínico como antiviral. Isso fornece maior suporte para o desenvolvimento de uma terapêutica eficaz contra o ZIKV.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Verificar se o tratamento com ivermectina induzirá o ZIKV (cepa BR15261) a adquirir resistência a essa droga.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Definir as condições ótimas de infecção em células A549;
- Avaliar o perfil de citotoxicidade da ivermectina (IVM) em células A549;
- Avaliar o perfil antiviral da IVM contra ZIKV em células A549
- Investigar se o ZIKV adquire resistência a IVM durante passagens seriadas em células A549 e C6/36;
- Avaliar parâmetros de infectividade de ZIKV durante as passagens seriadas sob pressão seletiva de IVM.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ZIKA VIRUS

#### 2.1.1 História e epidemiologia do ZIKV

Entretanto o ZIKV é assim chamado, pois foi isolado pela primeira vez na Floresta Zika (situada em Uganda no continente Africano) em abril de 1947, de macacos *Rhesus*, durante estudos com o YFV (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

O primeiro relato de infecção e isolamento do vírus, em humanos, foi na Nigéria em 1954 (MACNAMARA, 1954), seguida pelo primeiro relato clínico completo da doença quando Simpson (1964) descreveu sua própria infecção (HAYES, 2009). Apesar do vírus ter sido isolado repetidamente nos 50 anos seguintes à sua descoberta, poucos casos foram notificados até abril de 2007, quando uma epidemia ocorreu na Micronésia (DUFFY et al., 2009; HAYES, 2009; LANCIOTTI et al., 2008; NISHIURA et al., 2016). Seis anos mais tarde o vírus reapareceu na Polinésia Francesa, em uma epidemia, na qual aproximadamente trezentos pacientes foram infectados e desenvolveram a Síndrome de Guillain-Barré, uma alteração neurológica grave (AGRELLI et al., 2019; CAO-LORMEAU et al., 2014; PETTERSSON et al., 2018).

No Brasil, o primeiro caso de microcefalia neonatal (distúrbio neurológico no qual o cérebro da criança tem medidas menores do que o normal) foi notificado durante o mês de maio de 2015, na região Nordeste do país (FARIA et al., 2016; MASSAD et al., 2017; METSKY et al., 2017; WEAVER et al., 2017). Porém, não se tem a data exata de introdução do ZIKV no país. Evidências apontam que o vírus foi introduzido no Brasil entre o final de 2013 e início de 2014, disseminando-se posteriormente pelas Américas. Sua expansão ocorreu rapidamente, sendo que em menos de 15 meses afetou mais de 30 países das Américas, gerando um número estimado de 1,5 milhão de casos (FARIA et al., 2016; MASSAD et al., 2017).

O Brasil teve a maior epidemia descrita até o momento (STROTTMANN et al., 2019). De acordo com a Organização Pan Americana de Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), até o mês de janeiro de 2018 foram notificados no Brasil mais de 230 mil casos suspeitos da doença, com quase 140 mil casos confirmados (OPAS/OMS, 2018). Entretanto como o vírus continuou a circular no país, no intervalo

de dezembro de 2018 a dezembro de 2019, o Ministério de Saúde relatou a notificação de cerca de 11 mil prováveis casos de ZIKV, no Brasil. Sendo que a região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (9,5 casos/100 mil habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (taxa de incidência 5,8 casos/100 mil habitantes), Norte (taxa de incidência 4,3 casos/100 mil habitantes), Sudeste (taxa de incidência 4,0 casos/100 mil habitantes) e Sul (taxa de incidência 0,4 casos/100 mil habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Análises filogenéticas do genoma viral revelaram que todas as linhagens do ZIKV emergiram em Uganda, mas foram introduzidas em diferentes regiões do Continente Africano e Asiático de forma independente. Isso permitiu a divisão em duas linhagens principais, a Africana, representada pela cepa viral MR766 isolada na África Ocidental em 1947; e Asiática/Americana, representada pela cepa viral P6740 isolada da Malásia em 1966. A irradiação da cepa Asiática para o Ocidente fez com que esta sofresse uma adaptação natural ao novo ambiente, possibilitando o aparecimento da linhagem Americana e, dentro desta, o surgimento de alguns subgrupos como as estirpes brasileiras (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; SHARMA et al., 2019; STROTTMANN et al., 2019; YOKOYAMA; STARMER, 2017; ZHU et al., 2016).

No entanto, muito se investiga para explicar as disparidades das manifestações clínicas durante a infecção por ZIKV. No início, nos continentes africano e asiático, a doença tinha comportamento endêmico com poucos casos graves. Mas, a forma epidêmica mais recente verificada nas Ilhas do Pacífico e nas Américas passou a apresentar maior incidência de casos graves e incluir manifestações neurológicas e comprometimento fetal importantes. Hipóteses como, mutações genômicas das cepas virais, resposta imunológica alterada por infecções prévias por outros flavivirus, co-infecção com outros arbovírus, falhas nos sistemas de identificação e notificação de casos foram sugeridas como causas, mas nenhuma foi ainda confirmada (FAYE et al., 2014; FREIRE et al., 2015; HADDOW et al., 2012; LANCIOTTI et al., 2008; LING YUAN et al., 2017; RUSSELL, 2016).

### **2.1.2 Transmissão e patogênese**

A forma de transmissão vetorial do ZIKV é pela picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes* sp. (RATHER et al., 2017). Entretanto, já foi demonstrado que o vírus pode ser transmitido por via sexual, perinatal, pós-transfusional e exposição

ocupacional, o que pode ter contribuído para a rápida dispersão viral (DECKARD et al., 2016; FOY et al., 2011; GREGORY et al., 2017; VENTURI et al., 2016).

No Brasil, inicialmente a doença foi notificada como uma “Síndrome semelhante a *Dengue*” devido a semelhança com os sintomas característicos da dengue (BARJAS-CASTRO et al., 2016; ZANLUCA et al., 2015). As manifestações clínicas variam de leves a graves. As brandas apresentam evolução autolimitada, caracterizadas por exantema, febre baixa ou ausente, artrite ou artralgia, podendo haver conjuntivite não purulenta, mialgia, cefaleia, dor retro-orbitária, edema e vômitos. Seu curso é quase sempre benigno, não determinando a hospitalização, gerando assim uma subnotificação da doença na população e podendo gerar complicações graves (PETERSEN et al., 2016; PETTERSSON et al., 2018; ZANLUCA et al., 2015). Já a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ) em recém-nascidos é uma manifestação grave, que durante o surto no Brasil, provocou um grande impacto na saúde pública. A SCZ é caracterizada pela presença da microcefalia, juntamente com outras anomalias no sistema nervoso central, alterações oculares e auditivas, calcificações cerebrais e insuficiência placentária com restrição do crescimento fetal (COSTELLO et al., 2016; VENTURI et al., 2016; ZANLUCA et al., 2015). Outra manifestação clínica grave gerada pelo ZIKV é a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos (PETERSEN et al., 2016). Clinicamente, as primeiras alterações neurológicas iniciam a partir do sexto dia pós-infecção e tem progressão rápida da doença. Os sintomas iniciais envolvem formigamento nos membros inferiores e fraqueza muscular que pode levar a perda dos movimentos. Em seguida, a doença progride para a porção superior, atingindo os músculos respiratórios e provocando falência respiratória (KRAUER et al., 2017; MUSSO et al., 2015; WEAVER et al., 2017; ZANLUCA et al., 2015).

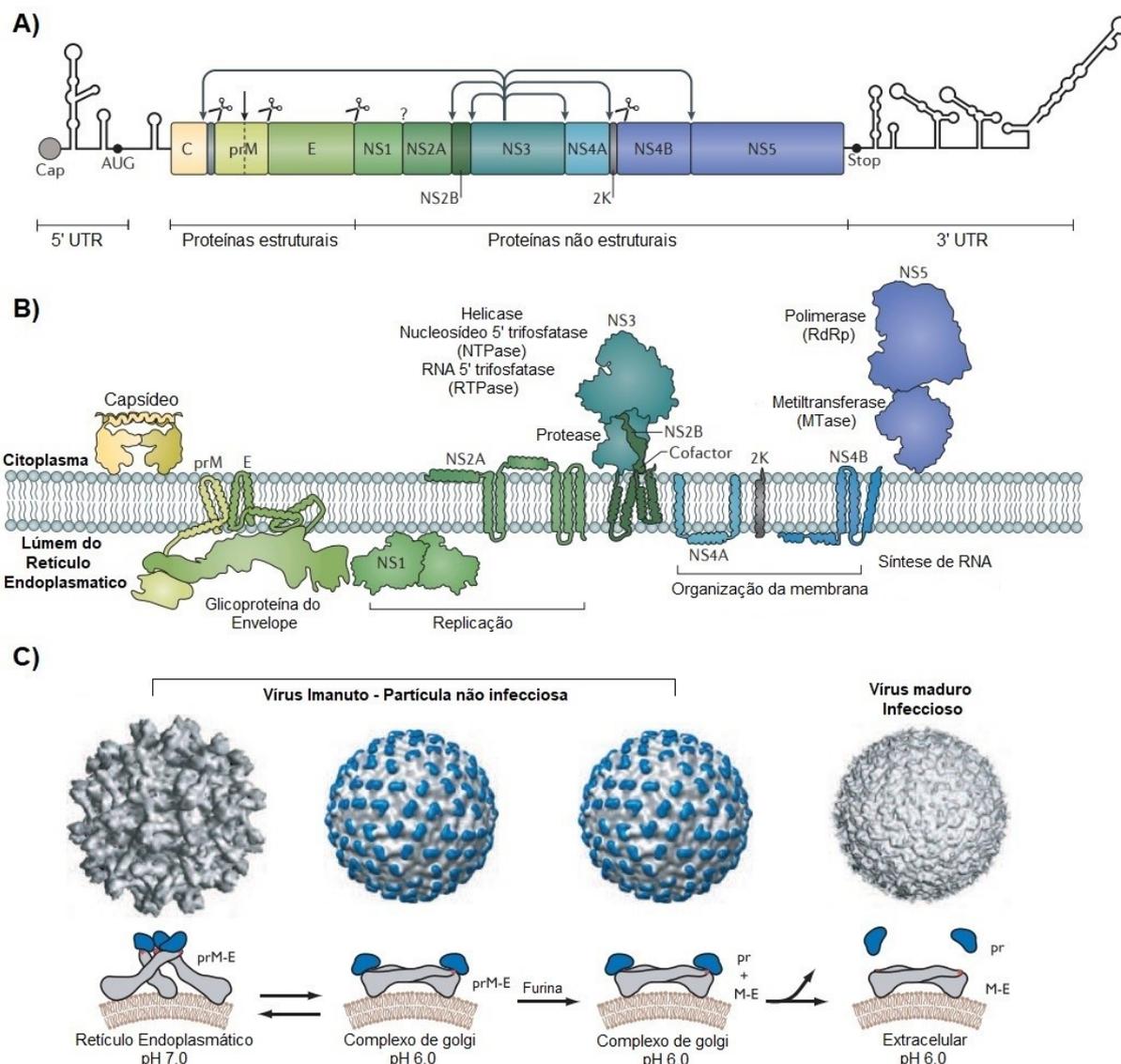
O diagnóstico clínico da doença causada pelo ZIKV não é específico (FAYE et al., 2008). São utilizados métodos moleculares, através do RNA viral extraído de fluidos biológicos incluindo soro, plasma, urina, saliva e líquido amniótico. Mas, a capacidade da técnica é limitada, uma vez que a viremia de ZIKV geralmente é baixa e limitada ao terceiro e quarto dia após o início da doença. Outra abordagem que pode ser utilizada é a sorológica, através da detecção de anticorpos IgM ou IgG específicos para o vírus, a partir de 5 a 6 dias após o aparecimento dos sintomas. Porém esta pode gerar reatividade cruzada devido à similaridade do ZIKV com outros flavivírus

como DENV, YFV e outros, resultando em falsos-positivos (JAVED et al., 2018; LANCIOTTI et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

### 2.1.3 Estrutura e genoma viral

O ZIKV é um vírus envelopado, com capsídeo de simetria icosaédrica e diâmetro médio de 50 nm. Seu genoma é constituído por uma única fita de RNA de sentido positivo [ssRNA (+)], contendo cerca de 11000 nucleotídeos (nt), flanqueado pelas regiões não codificantes 5' UTR e 3' UTR (do inglês *untranslated regions*). A extremidade 5' possui *cap* tipo I, enquanto que a região 3' não possui cauda poliadenilada (Figura 1A) (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; SAXENA et al., 2016). O genoma é por si só infeccioso e codifica uma única sequência aberta de leitura (ORF – do inglês *Open Reading Frame*), que é responsável por codificar uma longa poliproteína (Figura 1 A-B) (CHAMBERS et al., 1990; KNIPE; HOWLEY, 2013).

Durante a etapa de tradução a poliproteína precursora de 3.400 aminoácidos (aa) é clivada por proteases do vírus e da célula hospedeira, originando 3 PE (capsídeo (C), envelope (E) e pré-membrana ou precursora de membrana (prM) que após a clivagem torna-se (M)) e 7 NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1A-B) que são importantes na regulação da tradução e replicação viral (PETERSEN et al., 2016; SHI; GAO, 2017).



### Figura 1. Organização genômica e estrutura do ZIKV.

(A) A ORF que codifica a poliproteína de ZIKV e as estruturas secundárias previstas 5' e 3' UTR. O genoma contém uma estrutura de *cap* tipo 1 na extremidade 5'. A clivagem da poliproteína por peptidases de sinal celular é indicada por tesoura. As setas indicam a clivagem pela protease viral, enquanto a seta vertical preta indica a clivagem pela protease furina residente no complexo de Golgi. O ponto de interrogação indica uma clivagem da poliproteína de ZIKV realizada por uma protease desconhecida. (B) Localização e funções das PE e NS. (C) Topologia de membrana de proteínas virais maduras. As partículas virais imaturas, não infecciosas sofrem um rearranjo conformacional nas glicoproteínas virais E (cinza) e precursor M (prM) (azul) dependente de pH. Partículas infecciosas maduras se formam após a clivagem, pela proteína furina, da prM e liberação do fragmento pr.

Fonte: Adaptado de (KNIFE; HOWLEY, 2013; NEUFELDT et al., 2018)

As PE são essenciais para a formação da partícula viral, sendo que o ZIKV apresenta duas formas distinguíveis, a madura, encontrada fora das células e a imatura, exclusiva do meio intracelular (Figura 1C). A proteína do capsídeo maduro (C) desencadeia a clivagem da prM por meio da protease do hospedeiro furina, gerando uma proteína (M) madura e um peptídeo Pr. Este processo resulta em

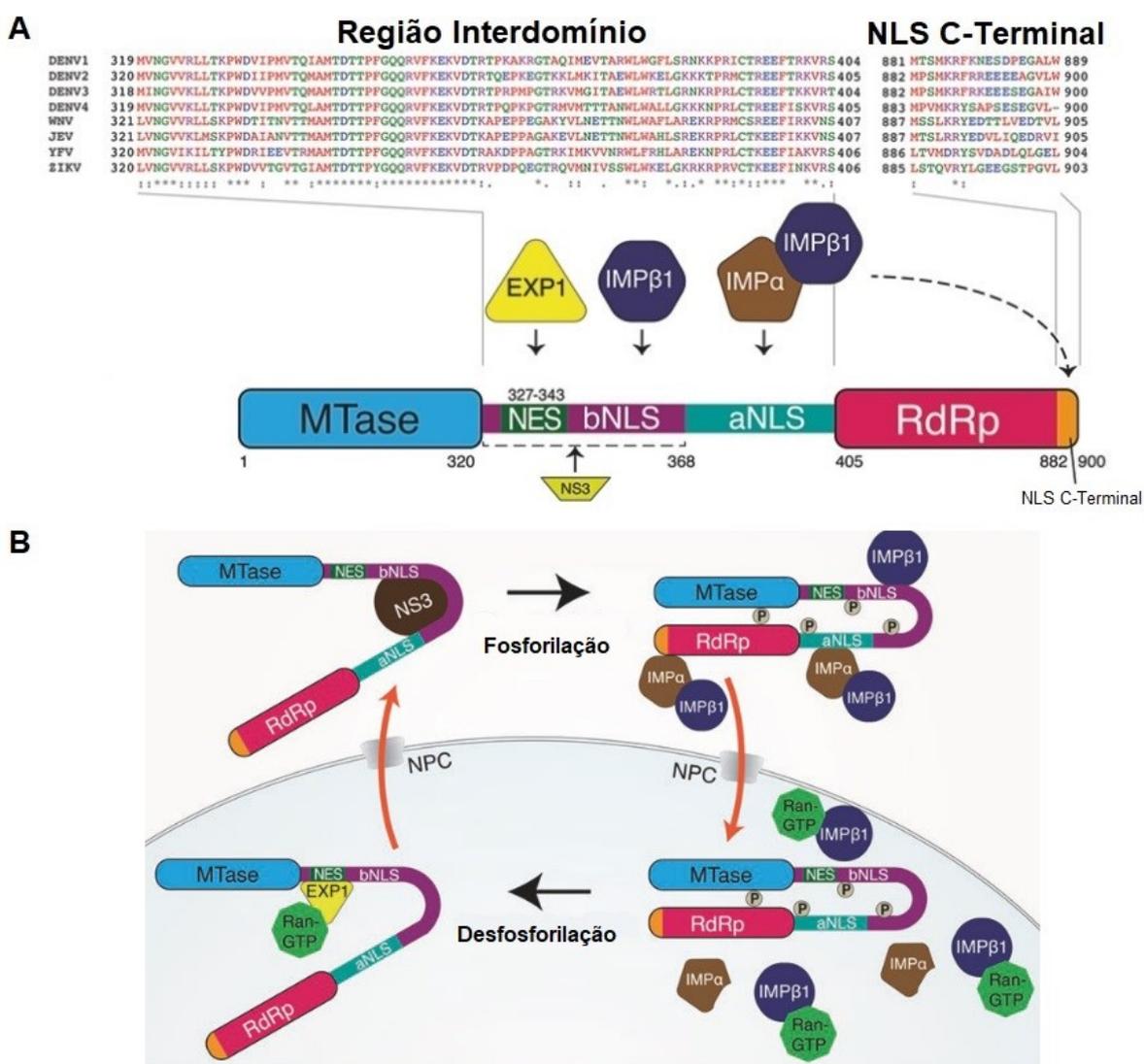
partículas virais maduras e infecciosas, que são encontradas fora das células. Além disso, a proteína E, que compõe a maior parte da superfície do vírion<sup>3</sup>, está envolvida na ligação à superfície da célula hospedeira, endocitose<sup>4</sup> e fusão com a membrana celular (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; BIDEET; GARCIA-BLANCO, 2018; GREEN et al., 2014; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006).

Já as proteínas NS executam funções essenciais na replicação do RNA viral, processamento e montagem da poliproteína, bem como alteração da resposta imune do hospedeiro contra o vírus (Figura 1A-B) (DAI et al., 2016; SHI; GAO, 2017). A NS1 é uma glicoproteína necessária no processo de replicação do RNA viral, que pode tanto ser retida nas células infectadas, quanto localizar-se na superfície celular e ser secretado lentamente pelas células dos mamíferos (Figura 1B). Já a NS2A atua nas mudanças entre a replicação do RNA viral e o seu empacotamento, participa no controle da expressão de interferon (IFN) durante a resposta antiviral e na secreção de partículas virais da célula hospedeira (JAVED et al., 2018). Por outro lado, a NS2B associa-se ao domínio C-terminal do NS3 para formar o complexo de serino-protease (NS2B-NS3) que está envolvido na clivagem da poliproteína viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006). Atualmente, esse complexo está sendo estudado como alvo para o desenvolvimento de possíveis antivirais (MILLIES et al., 2019; ROY et al., 2017). A NS3 é uma proteína multifuncional. Seu domínio N-terminal apresenta atividade de serino-protease que tem NS2B como um cofator; já seu domínio C-terminal possui atividades de helicase, nucleosídeo 5' trifosfatase estimulada por RNA (NTPase) e atividades do RNA 5' trifosfatase (RTPase), que desempenham papéis críticos no desenrolamento e translocação do RNA durante a replicação viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; SHI; GAO, 2017). NS4A e NS4B são polipeptídios hidrofóbicos que estão associados com o rearranjo estrutural e formação dos constituintes da membrana, respectivamente (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006).

---

<sup>3</sup> **Vírion:** Refere-se a uma única partícula viral que está fora da célula hospedeira.

<sup>4</sup> **Endocitose:** Entrada de substâncias em uma célula por englobamento das partículas através da membrana celular.



**Figura 2. Tráfego núcleo-citoplasmático da NS5.**

(A) As sequências da região interdomínio (esquerda) e do C-terminal (direita) são mostradas no código de letras de aminoácidos simples. Os alinhamentos de sequência são para as proteínas NS5 de DENV1–4 (GenBank AIU47321.1, AAK67712.1, AHN50411.1, AMP43484.1 respectivamente), YFV (GenBank NP\_041726.1), JEV (GenBank NP\_059434.1), WNV (GenBank ALF00101.1) e ZIKV (GenBank YP\_002790881.1). O símbolo '\*' abaixo de uma posição indica resíduos idênticos, enquanto ':' indica conservação de resíduos altamente semelhantes e '.' indica conservação de apenas algo semelhante. Alto grau de identidade das sequências é observado nas regiões interdomínio do NS5 dos vírus, enquanto o NLS C-terminal é menos conservado entre os vírus. O esquema abaixo mostra os domínios da NS5, com o domínio MTase (região N-terminal), separados da RdRp (C-terminal) pela região interdomínio. A região interdomínio contém dois NLS e uma sequência de exportação nuclear (NES), e seus parceiros de ligação propostos para IMP e EXP. (B) Tráfego núcleo-citoplasmático da NS5, ocorre através do NPC mediado pelo heterodímero de IMP  $\alpha/\beta$ 1 e Exp1, respectivamente, e provavelmente modulado pela hiperfosforilação de NS5.

Fonte: Adaptado de Jans e Martin, (2018).

Por fim, a NS5 de ZIKV é a maior proteína NS, com dois domínios essenciais para a replicação do genoma viral, que apresenta semelhanças com a NS5 do JEV e DENV-3 (Figura 2A) (WANG et al., 2017a). Seu domínio N-terminal tem atividade de

MTase, envolvida no capeamento e na metilação da região 5', enquanto o domínio C-terminal tem atividade de RdRp, por iniciar a síntese de novas fitas de RNA viral (CHAUDHARY et al., 2017; MILANI et al., 2009; WANG et al., 2017a).

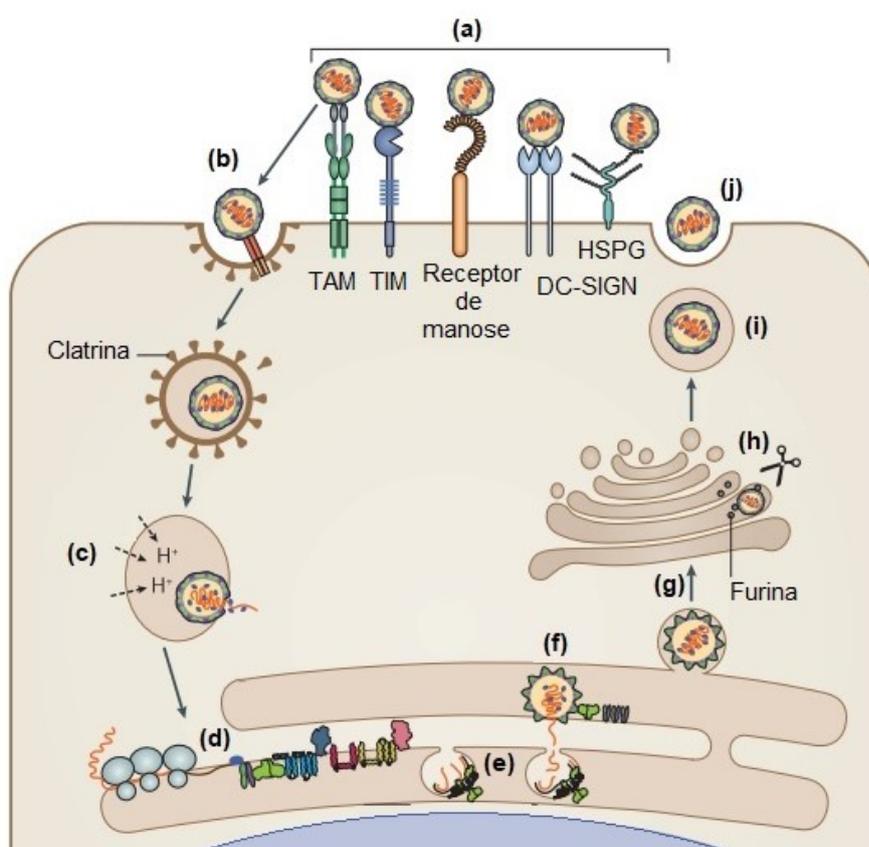
Embora a NS5 possa formar um complexo com o NS3 para estimular as atividades de NTPase e RTPase da NS3 no citoplasma (TAY; VASUDEVAN., 2018), trabalhos demonstraram que a NS5 de DENV-2, em sua forma fosforilada (KAPOOR et al., 1995) localiza-se no núcleo enquanto as que não foram fosforilada permanecem abundantemente ligada à NS3 no citoplasma (BROOKS et al., 2002; FRASER et al., 2014; ZHANG et al., 2017). Isso é possível devido ao transporte núcleo-citoplasmático mediado por IMP, uma família de proteínas que reconhecem NLS de proteínas grandes (>45 kD), para carregá-las até o núcleo celular via complexos de poros nucleares (NPCs) (Figura 2) (JANS; MARTIN; WAGSTAFF, 2019; WAGSTAFF; JANS, 2006). No entanto, as IMP podem ser encontradas em forma de homodímeros (IMP  $\beta$ 1) que reconhecem bNLS ou heterodímeros (IMP  $\alpha/\beta$ 1), que identificam aNLS. Diante disso, o NLS presente na região interdomínio, que medeia a interação entre NS5 e NS3, é identificado pelo heterodímero de IMP  $\alpha/\beta$ 1, transportando a NS5 fosforilada para núcleo celular (Figura 2) (JANS; MARTIN, 2018; TAY; VASUDEVAN., 2018; WANG et al., 2017a). Mutações em qualquer um desses sinais tem efeitos drásticos na viabilidade do vírus, como por exemplo, a mutação de 5 resíduos de lisina (K) dentro do aNLS para alanina (A), resulta em efeitos tão graves na replicação viral que o vírus é incapaz de ser recuperado (FRASER et al., 2014; PRYOR et al., 2007; RAWLINSON et al., 2009).

No núcleo celular, a NS5 pode antagonizar a resposta ao IFN, citocina com efeito antiviral do hospedeiro, interagindo e promovendo a degradação do STAT2 (ZHAO et al., 2017), bem como modular a produção de Interleucina 8 (IL-8) pelas células infectadas (LUNDBERG et al., 2013; PRYOR et al., 2007; RAWLINSON et al., 2009).

#### **2.1.4 Replicação viral e resposta imune**

Após entrar em contato com a derme humana o ZIKV é capaz de invadir diversos tipos celulares que vão desde a camada superficial até aquelas mais profundas da pele, como os queratinócitos, fibroblastos e células dendríticas. A primeira etapa para a infecção é a interação da glicoproteína E do envelope viral com

receptores específicos do hospedeiro como DC-SIGN (do inglês, *Dendritic Cell Specific*, receptores específicos de células dendríticas), receptor de manose em macrófagos, TAM (AXL, TYOR3) e TIM 1 (pertencentes a família das fosfatidilserina, que participam das vias de regulação de apoptose<sup>5</sup>) (Figura 3 (a)) (KNIPE; HOWLEY, 2013; STRANGE et al., 2019). Em seguida, ocorre o processo de endocitose mediado por proteínas clatrina, que permitem a entrada do vírus na célula através de uma vesícula derivada da membrana celular (b) (KNIPE; HOWLEY, 2013; YUN; LEE, 2017).



**Figura 3. Ciclo replicativo do ZIKV.**

(a) Ligação da partícula viral aos receptores de superfície celular. (b) Endocitose viral via clatrina. (c) Fusão das membranas virais e celulares (d) Tradução da poliproteína viral (e) Sítio de replicação e multiplicação do genoma viral (f) Sítio de montagem (g) Transporte das partículas virais imaturas pela via secretora. (h) Maturação da partícula viral (i) Vírus maduro. (j) Liberação da partícula viral por exocitose.

Fonte: Adaptado de Neufeldt et al. (2018).

Ao atingir o endossomo, o pH ácido possibilita uma mudança conformacional da proteína do E viral, resultando na liberação do RNA viral no citoplasma (c). Dessa

<sup>5</sup> **Apoptose:** Morte celular programada que ocorre de maneira controlada e ordenada através de modificações morfológicas como condensação e encolhimento, colapso do citoesqueleto, dissolução do envelope nuclear e fragmentação da cromatina.

forma, a tradução da poliproteína viral é iniciada (d), sendo posteriormente clivada em proteínas individuais mediante ação de proteases virais e do hospedeiro. As proteínas resultantes da clivagem participam tanto da replicação do RNA, como da montagem da progênie viral (e) (DUAN et al., 2019; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008; SAXENA et al., 2016).

No retículo endoplasmático (RE) ocorre a junção do RNA replicado com a proteína C em sua forma heterodimerizada, formando uma partícula imatura e não infecciosa (f). Em seguida, o vírion ainda imaturo recebe o envelope oriundo da membrana dessa organela (g), e segue através de canais secretórios para o complexo de Golgi (g), onde ocorre sua maturação mediada pela proteína furina (h). O amadurecimento da nova progênie é marcado pela clivagem da prM, que leva a uma mudança conformacional na superfície do vírion (i). Após este processo, a partícula viral é secretada para o ambiente extracelular por exocitose<sup>6</sup> onde poderá infectar novas células (j), reiniciando o ciclo de transmissão e replicação viral (SIROHI; KUHN, 2017).

Entretanto estudos recentes demonstraram que o processo de replicação do ZIKV gera a ativação de uma resposta imune antiviral inata e a produção de interferon do tipo I (IFN-I) em células infectadas (GÖERTZ et al., 2018; KNIPE; HOWLEY, 2013). De acordo com Kumar et al. (2016), as proteínas NS1, NS4A são capazes de inibir as vias de sinalização e do IFN-I através da supressão de IRF3 (fator regulador de interferon 3) e NF-κB, enquanto o domínio MTase da NS5 interage e promove a degradação proteossomal do STAT-2, prejudicando a via indutora do IFN-I. Em virtude disso não ocorre a transcrição dos genes estimulados por IFN (ISGs) que são responsáveis por ativar do estado antiviral celular para combater a infecção (KUMAR et al., 2016; SERMAN; GACK, 2019).

Além disso, a infecção por ZIKV ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios com consequente produção de citocinas como IL-1β, em células epiteliais humanas. Também já foi demonstrado sua capacidade de induzir autofagia<sup>7</sup> em fibroblastos, alterar a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e apoptose, bem como

---

<sup>6</sup> **Exocitose:** processo ativo no qual o material intracelular é transportado, através de vesículas, para o meio extracelular.

<sup>7</sup> **Autofagia:** processo catabólico celular que gera a degradação de componentes da própria célula via lisossomos.

de comprometer a produção de novos neurônios (HAMEL et al., 2015; LI et al., 2016; SOUZA et al., 2016).

Em relação a resposta imune adquirida, as informações atuais mostram a importância das células T e células B na infecção pelo ZIKV. A produção de anticorpos auxilia tanto na resolução da infecção, através da neutralização dos epítomos presentes na proteína do E, quanto pode aumentar a gravidade da infecção devido a presença de anticorpos heterólogos. Uma vez que estudos demonstraram uma maior carga viral na infecção pelo ZIKV, em indivíduos com contato prévio quando os indivíduos já haviam tido contato anterior com DENV (MCARTHUR, 2017; SLON CAMPOS; MONGKOLSAPAYA; SCRETON, 2018; SMITHBURN, 1952).

### **2.1.5 Tratamento atual e perspectivas**

Até o momento, não existe terapia específica para prevenir ou tratar adultos, tampouco para evitar danos no feto durante a gravidez após a infecção por ZIKV (BARROWS et al., 2016; DONG; KANG; DIMOPOULOS, 2019; GAO et al., 2019). O tratamento é sintomático e de suporte geral, que depende da gravidade do quadro clínico e das disfunções orgânicas presentes (DONG; KANG; DIMOPOULOS, 2019). São utilizadas drogas que auxiliam na redução dos sintomas, como paracetamol ou dipirona, para controlar a febre e as dores, além de anti-histamínicos para minimizar o exantema maculopapular. Além disso, o ácido acetilsalicílico e outras drogas anti-inflamatórias são contraindicados devido à dificuldade do diagnóstico clínico diferencial em relação a dengue, o que poderia aumentar o risco de complicações hemorrágicas. Também é indicada reidratação ativa ou passiva dos pacientes frente a quadro emético (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SAXENA et al., 2016).

Além disso o controle vetorial é de suma importância, sendo aconselhado a utilização de telas de proteção em janelas, mosquiteiros e repelentes. Também é indicado que as pessoas utilizem roupas claras e longas, tenham cuidado adicional nas primeiras horas da manhã e no final da tarde, pois é o período de maior atividade do vetor (GREGORY et al., 2017; PETERSEN et al., 2016). Para as mulheres grávidas o cuidado deve ser redobrado. Em virtude disso, o Ministério da Saúde recomenda que estas evitem fazer viagens desnecessárias para áreas endêmicas e não tenham relações sexuais desprotegidas. Já indivíduos que tenham viajado para área de transmissão do ZIKV devem adiar a doação de sangue por pelo menos 28 dias.

Apesar destes métodos não conseguiram conter as recentes epidemias causadas por arbovírus, eles auxiliam no controle da disseminação do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Atualmente, não há vacina disponível para a prevenção do ZIKV. Um total de 45 vacinas encontram-se em várias fases de desenvolvimento e estão sendo avaliadas, desse total seis já estão na fase I de testes clínicos em humanos. Sendo desenvolvidas com diferentes tecnologias: vírus inativado, peptídeo sintético, uma de RNA, duas de DNA e uma recombinante (FERNANDEZ; DIAMOND, 2017; MCARTHUR, 2017).

O processo de desenvolvimento de novos medicamentos requer um grande esforço, é de alto risco, dispendioso e longo, geralmente levando mais de 10 anos. Neste caso, outro desafio enfrentado é que a infecção clínica pelo ZIKV é geralmente leve, e a população alvo primária seriam mulheres grávidas, principalmente aquelas com risco de complicações neurológicas. Porém existem várias considerações éticas envolvidas no desenvolvimento de terapêuticas durante a gravidez. Em geral, as mulheres grávidas são excluídas dos ensaios clínicos de novos compostos. Portanto para que a inclusão desta população seja justificada, o agente precisa ser de baixo risco tanto para a mãe quanto para o feto, além de ser prático para uso em ambientes com recursos limitados (MCARTHUR, 2017).

Neste sentido, o reposicionamento de drogas é uma alternativa estratégica para a descoberta de novas aplicações. Isso porque os compostos já passaram por estudos de citotoxicidade, ensaios clínicos, os efeitos colaterais e interações cruzadas são conhecidos, além de já estarem sendo utilizados pela população (BARROWS et al., 2016; SAXENA et al., 2016). Em virtude disso muitos estudos estão sendo realizados, como por exemplo o de Bullard-Feibelman et al. (2017), que demonstrou que o sofosbuvir, uma droga antiviral contra vírus da hepatite C (HCV) aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), inibiu a replicação e infecção por ZIKV na cultura de tecidos, bem como camundongos protegidos contra a morte induzida por ZIKV. Um ano mais tarde KIM et al. (2018) avaliou os efeitos antivirais do favipiravir (inibidor potente e seletivo da RdRp do vírus Influenza A) e ribavirina (análogo da guanosina que possui atividade de amplo espectro contra vários vírus de RNA e DNA, como influenza A e B e HCV) contra cepas asiáticas e africanas de ZIKV em diferentes tipos de células, incluindo células progenitoras neuronais humanas (hNPCs), fibroblastos dérmicos humanos (HDFs), células A549 e células Vero. Seus resultados

demonstraram que ambas as drogas possuem atividade antiviral robusta nos vários tipos de células analisados, além do favipiravir proteger as células hNPCs da morte celular mediada pelo ZIKV.

Por fim, o estudo de Barrows et al. (2017) destacou-se ao examinar uma biblioteca de 774 drogas (ou ativos) aprovados pelo FDA. Essa triagem identificou mais de 20 compostos capazes de reduzir a infecção de ZIKV *in vitro*. Dentre estes se destaca a ivermectina (IVM) que já se encontra em testes clínicos de fase 2 e 3 em pacientes infectados com DENV, na Universidade Mahidol, na Tailândia (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE., 2015)

## 2.2 IVERMECTINA (IVM)

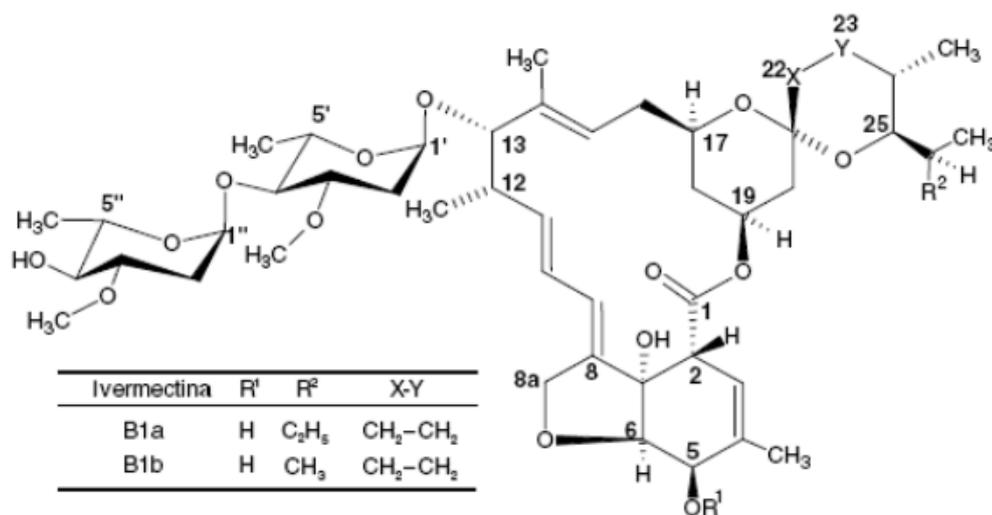
A IIVM (22,23-di-hidro-ivermectina B1) é um fármaco amplamente utilizado como antiparasitário em humanos e animais (ROHRER; ARENA, 1995). Esta droga é uma mistura de duas avermectinas<sup>8</sup>, modificadas quimicamente que contém pelo menos 80% de 22,23 dihidroivermectina-B1a e menos de 20% de 22,23 dihidroivermectina B1b, que diferenciam-se entre si pelo grupo orgânico substituinte presente no carbono 25, conforme demonstrado na Figura 4. Foi descoberta e avaliada em 1974, no Instituto japonês Kitasato a partir dos micélios de *Streptomyces avermectins* sp., e passou a ser comercializada, inclusive no Brasil, em 1981 pela empresa *Merck Sharp & Dohme*, como o primeiro antiparasitário do grupo das lactonas macrocíclicas<sup>9</sup> (CROCI et al., 2016; MOLINARI et al., 2009; ROHRER; ARENA, 1995).

Atualmente com base nos registros da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, existem 39 medicamentos à base de IVM registrados, variando entre comprimidos e creme, considerando somente fármacos para uso em humanos.

---

<sup>8</sup> **Avermectinas:** derivado dissacarídeo de lactonas pentacíclicas de 16 membros, denominadas avermectinas A1a-B2b, extraídas da fermentação natural do actinomicete *Streptomyces avermitilis*, encontrados no solo. São altamente lipofílicos, pouco solúveis em água, mas facilmente solúveis em solventes orgânicos (CAMPBELL, 2012).

<sup>9</sup> **Lactonas macrocíclicas: Composto químico com potente** atividade endectocida por inibir a sobrevivência de endoparasitas (principalmente nematoides) e ectoparasitas (artrópodes que se alimentam de sangue de um paciente tratado) (CHACCOUR et al., 2013).



**Figura 4. Estrutura química da Ivermectina.**

22,23-di-hidroaivermectina B1a e B1b (C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>O<sub>14</sub>) Peso molecular: 875.1 g/mol.

Fonte: Adaptado de (PUBCHEM)

Este fármaco é utilizado para tratar infecções como sarna, piolho e oncocercose, mas também já foi indicado como uma estratégia eficaz e complementar para a erradicação da malária (CHACCOUR et al., 2013; KOSYNA et al., 2015). Seu mecanismo de ação consiste em ativar canais de cloro controlados tanto por glutamato<sup>10</sup> quanto pelo ácido gama-aminobutírico<sup>11</sup> (GABA) que estão localizados em células musculares somáticas. A abertura dos canais de cloro permite o influxo de íons cloreto, hiperpolarizando a membrana do neurônio, resultando na paralisia motora e eliminação do parasita. Nos nematódeos, isso ocorre entre células nervosas, enquanto nos artrópodes acontece entre células nervosas e musculares. Nos invertebrados, os sítios de ligação da droga está localizado no tecido periférico, enquanto nos mamíferos estes sítios estão confinados no sistema nervoso central (SNC) (CHABALA et al., 1980; CHACCOUR et al., 2013; ROHRER; ARENA, 1995). Entretanto a IVM parece não ter capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, o que justifica sua atividade apenas nos parasitas e confere um excelente perfil de segurança a droga (CHACCOUR et al., 2013; CRUMP; OMURA, 2011).

<sup>10</sup> **Glutamato**: neurotransmissor excitatório essencial no desenvolvimento do aprendizado e memória.

<sup>11</sup> **GABA**: Neurotransmissor inibitório que atua na regulação da excitabilidade dos neurônios do encéfalo.

No entanto, estudos recentes demonstram que a IVM pode ter outras funções, como inibir a importação nuclear dependente de IMP  $\alpha/\beta$ 1 de forma específica (WAGSTAFF et al., 2011, 2012). Como já havia sido demonstrado por (BROOKS et al., 2002; PRYOR et al., 2007; RAWLINSON et al., 2009), esse complexo proteico é responsável pelo transporte núcleo-citoplasmático da NS5 de DENV. Em virtude disso, outros estudos surgiram e demonstraram que a IVM pode atuar como um potente antiviral inibindo a replicação de DENV, *Human immunodeficiency virus* (HIV), YFV, JEV e TBEV (FRASER et al., 2014; MASTRANGELO et al., 2012; TAY et al., 2013; WAGSTAFF et al., 2012), bem como sobre ZIKV (BARROWS et al., 2016; KETKAR et al., 2019; NG et al., 2019; WANG et al., 2017b). Além disso, é capaz de atuar sobre o *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), alterando a distribuição das proteínas do capsídeo em células de mamíferos (KOSYNA et al., 2015; LUNDBERG et al., 2013).

No entanto, o mecanismo de ação como antiviral ainda não é totalmente claro, sugere-se que seja através da inibição da importação nuclear mediada por IMP  $\alpha/\beta$ 1, o qual bloqueia a translocação da NS5 de DENV do citoplasma para o núcleo, interferindo fortemente na replicação viral (WAGSTAFF et al., 2011, 2012). Porém, Mastrangelo et al., (2012) relatou que a IVM atuaria inibindo a atividade de helicase da NS3 dos flavivirus. Portanto vários estudos ainda precisam ser feitos para que isso seja elucidado.

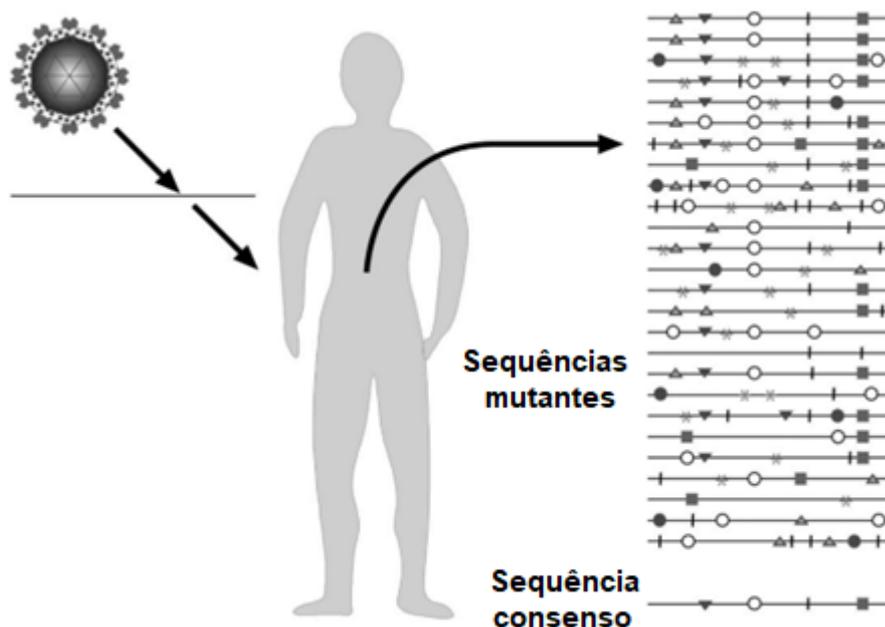
### 2.3 TEORIA EVOLUTIVA DE QUASISPÉCIES VIRAIS

Atualmente muito se estuda sobre a resistência viral às vacinas e drogas antivirais, isso porque os vírus de RNA conseguem adaptar-se rapidamente em ambientes dinâmicos, bem como escapar do sistema imunológico do hospedeiro. Esta rápida adaptação é relacionada com as altas taxas mutacionais, rápida cinética replicativa, população numerosa de partículas e grande diversidade genética (DOMINGO et al., 2005; LAURING; ANDINO, 2010; PADMANABHAN; DIXIT, 2015). Portanto, sua dinâmica evolutiva é complexa, cuja compreensão representa um desafio para a genética e para as estratégias de intervenção terapêutica efetiva (CIOTA et al., 2007b; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; LIU et al., 2016; SANZ-RAMOS et al., 2008)

Para descrever biologicamente e matematicamente a evolução dos vírus com genoma de RNA, a teoria de quasispécies tem sido amplamente utilizada, e muitas de suas previsões foram validadas experimentalmente (DOMINGO, 1997; DOMINGO et al., 2006; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; SCHUSTER, 2015). Esta teoria traz consigo vários conceitos que podem nos ajudar a compreender um pouco sobre a resistência às drogas, perda de infectividade e aumento da virulência dos vírus. Ela foi formulada originalmente por Manfred Eigen, em 1971, para caracterizar a grande diversidade genotípica de uma população de vírus (EIGEN, 1971; EIGEN; SCHUSTER, 1982; SANZ-RAMOS et al., 2008). O conceito de quasispécies adiciona um novo fator nas discussões evolucionistas, pois o alvo da seleção não é apenas o indivíduo mais adaptado da população, e sim toda ela, levando em conta todos indivíduos mutantes (DOMINGO et al., 1998; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012).

Sendo assim, os *Flavivirus* não são uma população clonal de um único vírus, mas uma mistura de várias espécies genômicas virais, denominadas como quasispécies (KHOU; PARDIGON, 2017). Essas misturas de mutantes são intimamente relacionadas, apresentando pelo menos uma sequência de consenso entre todas as suas quasispécies, que cooperam entre si para produzir o fenótipo geral do vírus, influenciando tanto na patogênese quanto a responsividade terapêutica (KAUTZ; FORRESTER, 2018; KHOU; PARDIGON, 2017). Isso é possível devido à alta taxa mutacional que a RdRp (NS5) pode gerar (ARIAS et al., 2013; BASSI et al., 2018). Estima-se que ocorra em média uma incorreção por 10.000 bases replicada, ou seja, basicamente o tamanho do genoma de muitos vírus de RNA (DOMINGO et al., 1996; RUÍZ-JARABO et al., 2002). Essas frequências de erro nos vírus de RNA são muito próximas ao valor máximo compatível com a manutenção genética, chamada de limiar de erro, que afeta diretamente a viabilidade dos vírus. Sendo assim o genoma evolui em diferentes taxas, variando de acordo com a região e a pressão a que ela está submetida (GALLEGO et al., 2018; KAUTZ; FORRESTER, 2018; VIGNUZZI et al., 2006).

A Figura 5 descreve esquematicamente a composição e a complexidade de uma população de quasispécie em um organismo hospedeiro.



**Figura 5. Descrição esquemática de uma população de quasispécie viral.**

A infecção por um único genoma viral resulta na geração de vários mutantes, alguns dos quais são representados à direita. Os genomas são representados como linhas horizontais e as mutações como símbolos nas linhas. A sequência consenso (parte inferior) é a que inclui, em cada posição, o resíduo encontrado com mais frequência na posição correspondente dos mutantes. A complexidade (número médio de mutações por genoma) e a composição de uma quasispécie viral são determinantes importantes do comportamento biológico de um vírus.

Fonte: (DOMINGO et al., 2006)

Demonstrações experimentais dessa teoria foram obtidas em cultura de células com vírus de várias famílias diferentes, onde um aumento das frequências de mutações das quasispécies virais ocorreram em consequência de pressões químicas ou da presença de uma polimerase de menor fidelidade, resultando na diminuição da infectividade viral e patogênese *in vivo* (ARIAS et al., 2013; CROTTY; CAMERON; ANDINO, 2001; VIGNUZZI et al., 2006; YAN et al., 2018; YUSTE et al., 1997).

*Fitness* é definido como a capacidade de uma entidade biológica em transferir suas informações genéticas para a próxima geração. É medido por meio da capacidade de um determinado genótipo (ou fenótipo) persistir em uma população ao longo de várias gerações podendo ser classificado como *fitness* absoluto ou relativo (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; RUÍZ-JARABO et al., 2002). *Fitness* absoluto é a razão entre o número de indivíduos presentes em uma população antes e depois de uma geração ou de determinado intervalo de tempo. Enquanto que o *fitness* relativo pode ser quantificado por meio de experimentos de competição com um vírus de referência (DOMINGO, 1997; YUSTE et al., 1997). Desta forma o *fitness* aumenta de forma exponencial conforme a população viral é subcultivada em células,

até atingir um platô, favorecendo os vírus com alto desempenho (DOMINGO et al., 1996, 2006).

É importante ressaltar que, durante a replicação e disseminação, as populações estão sujeitas a frequentes acúmulos de mutações deletérias, causando um declínio no *fitness* viral (DOMINGO, 1992; DOMINGO et al., 1996; EIGEN, 2002; EIGEN; SCHUSTER, 1982). Portanto, a medida de *fitness* de uma espécie ou quasiespécies viral possui relação direta com a taxa de replicação média da população, uma vez que as modificações do ambiente e as limitações do tamanho da população influenciam diretamente nesse valor (MANRUBIA; DOMINGO; LÁZARO, 2010). Dessa forma, quando uma população de vírus é submetida a um processo evolutivo, é esperado que sua constituição, tanto genotípica quanto fenotípica, mude (CIOTA et al., 2007a, 2007b, 2007c).

Sabe-se que muitos vírus de RNA se replicam perto do seu limite do erro, tornando-os sensíveis à aumentos da taxa mutacional. Quando a taxa mutacional chegou em seu ponto crítico, também chamado de limite de erro, uma população viral entra em erro catástrofe. Esse processo retarda a extinção da população, uma vez que a quasiespécie com maior *fitness* foi perdida devido às altas taxas mutacionais, os genótipos com menor *fitness* precisam evoluir para que não ocorra mutagênese letal (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012).

Devido à sua possibilidade de aplicações práticas, uma das mais importantes implicações do conceito de limite do erro e de erro catástrofe, é o conceito de mutagênese letal, que consiste no excesso de mutações introduzidas na replicação do RNA viral, podendo ser induzida por pressões biológicas ou químicas (CROTTY; CAMERON; ANDINO, 2001; TEJERO; MONTERO; NUÑO, 2015). Mas também pode ser vista como uma perda abrupta do *fitness* replicativo mediado por um aumento do número de mutações por genoma nos componentes de uma quasiespécie viral (DOMINGO et al., 2019; GREGORI et al., 2016; PERALES et al., 2019).

Em virtude disso, moléculas mutagênicas estão sendo empregadas em estudos para forçar ainda mais o aumento da taxa mutacional viral. Um exemplo é a ribavirina, um análogo sintético da guanosina usada clinicamente para o tratamento do HCV, que demonstrou ser capaz de induzir mutagênese letal no hantavírus, no vírus da poliomielite e no ZIKV. Interessantemente no ZIKV, 5 passagens em células Vero tratadas, gerou uma frequência de mutação tão alta que seu *fitness* foi perdido totalmente. Diferente disso, nos primeiros estudos feitos com *Vesicular stomatitis virus*

(VSV), foi observado que os mutagênicos químicos apenas reduziram o *fitness* viral (ARIAS et al., 2013; BASSI et al., 2018; CROTTY; CAMERON; ANDINO, 2001; GALLEGO et al., 2018; LAURING; ANDINO, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados para o vírus da coriomeningite linfocitária (LCMV) e o vírus da febre aftosa (VFA) (ARIAS et al., 2004; DE LA HIGUERA et al., 2017).

Portanto drogas mutagênicas podem induzir os vírus a erro catástrofe, fazendo com que o *fitness* diminua de tal forma que leve a sua letalidade. Com base nisso é proposto que induzir os vírus ao processo de extinção por mutagênese letal, pode ser uma estratégia terapêutica eficaz contra infecções causadas por vírus de RNA (ARIAS et al., 2013). Mas ainda é necessário que mais pesquisas sejam feitas para que a mutagênese letal seja considerada uma estratégia terapêutica inspirada nos modelos teóricos de evolução viral (DOMINGO et al., 2006, 2019; LAURING; ANDINO, 2010; PERALES et al., 2012).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas células aderentes de linhagem A549 (células epiteliais do tipo II de adenocarcinoma alveolar humano – ATCC®, CCL-185™) e células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano – ATCC®, CCL-81™), foram mantidas e propagadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F-12 1X, GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) suplementado com: 5% de soro fetal bovino (SFB, - GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S – GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Todas as linhagens celulares de mamíferos foram incubadas em estufa úmida à 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

Para preparar as células para os experimentos a monocamada de células das garrafas de cultura foi lavada uma vez com solução salina 0,9% estéril (Eurofarma), e as células aderentes foram soltas através da adição de tripsina/EDTA 0,05% (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). As células permaneceram incubadas com tripsina/EDTA em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 5 min, após foram então individualizadas através do jateamento vigoroso por pipetagem. Uma alíquota das células foi então diluída 20 vezes em reagente azul de tripan (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) para contagem em câmara de Neubauer. Após a quantificação, as células foram diluídas em meio DMEM/F12 completo, e distribuídas homoganeamente nos poços. As placas permaneceram incubadas por 16 a 24h, para total aderência da monocamada celular e para a confluência ideal para realização dos experimentos (70 a 80%).

Células semiaderentes C6/36 (células de *Aedes albopictus* clone C6/36 – ATCC®, CRL-1660™) foram mantidas e propagadas em meio Leibovitz's L15 (L-15– GIBCO, Thermo Fisher Scientific) suplementado com: 5 % de SFB (GIBCO - Thermo Fisher Scientific), 0,26 % de Triptose (Thermo Fisher Scientific), e 1% de P/S (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Incubadas à temperatura de 28 °C.

Para preparar os experimentos, a monocamada de células das garrafas de cultura foi lavada uma vez com solução salina 0,9% estéril (Eurofarma), após um volume pequeno de meio L-15 foi adicionado e as células aderidas removidas com auxílio de um rodo para cultura celular (Cell Scraper – Kasvi). Para completa

separação, as células foram individualizadas através do jateamento vigoroso por pipetagem. A contagem e diluição das células foram realizadas da mesma forma que para as outras células. As placas permaneceram incubadas pelo mesmo tempo que as outras, apenas sendo mantidas a 28 °C.

Todas as linhagens celulares foram testadas rotineiramente para contaminação por mycoplasma, conforme protocolo padronizado no laboratório.

## 3.2 ENSAIOS VIRAIS

### 3.2.1 Preparação dos estoques virais

Células C6/36 foram semeadas em uma confluência de 80% ( $9 \times 10^7$  células) em garrafa de 225 cm<sup>2</sup> que foi mantida a 28 °C *overnight*. No dia seguinte as células foram infectadas com Multiplicidade de Infecção (MOI) 0,1 por 5 dias para produção de ZIKV BR 2015/15261 (STROTTMANN et al., 2019) passagem 9. Foram mantidas em meio L-15 completo a 28 °C em estufa úmida. Após o período de expansão do vírus o sobrenadante da cultura foi coletado, centrifugado a 460 x g por 10 min a 4 °C, aliquotado em microtubos e armazenados a - 80 °C. A quantificação do título viral foi feita conforme descrito no item 3.2.3, sendo o título de ZIKV  $4 \times 10^6$  PFU/mL. Todos os ensaios virais realizados neste trabalho foram feitos com esse lote de vírus.

### 3.2.2 Infecção viral

Para realizar as infecções virais, as células da linhagem de interesse foram plaqueadas no dia anterior ao experimento, como descrito no item 3.1. No dia da infecção preparou-se o inóculo viral, a partir do estoque (título de ZIKV  $4 \times 10^6$  PFU/mL) conforme a multiplicidade de infecção (MOI) desejada, em meio sem SFB. Esta suspensão viral foi distribuída pelos poços e incubadas por 90 minutos. Os volumes adicionados em cada poço variaram dependendo da placa utilizada. Após o período de adsorção do vírus, as células foram lavadas com salina 0,9 % (Eurofarma®) para remoção de partículas virais que não foram adsorvidos. Em seguida o meio da respectiva linhagem celular foi adicionado e as células seguiram para estufa até o término do tempo de infecção.

### 3.2.3 Titulação viral por placas de lise

Para a realização desta técnica, células Vero foram semeadas em uma densidade de  $4 \times 10^5$  células/poço em placa de 24 poços no dia anterior, conforme descrito no item 3.1. No dia seguinte, as amostras a ser tituladas foram descongeladas e diluições seriadas dos vírus ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em meio DMEM/F12 com P/S e sem SFB, foi preparado. Em seguida, as células Vero foram incubadas com 300  $\mu$ L de cada diluição de vírus por poço. O mesmo foi feito com os poços *mock*, porém utilizando 300  $\mu$ L de meio sem adição de vírus. As placas permaneceram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 90 minutos. Após esse tempo, o meio foi removido e acrescentado 500  $\mu$ L de meio DMEM semissólido: meio DMEM F-12 com 1 % SFB, 1 % P/S e 1,6 % de CMC (Carboximetilcelulose de sódio – Sigma-Aldrich) por poço e mantidas em estufa por 5/6 dias. Este meio semi-sólido impede que a progênie viral ao sair da célula infectada se espalhe, alcançando desta forma apenas as células vizinhas o que gera uma placa de lise na monocamada de células.

Passados os 5/6 dias, 500  $\mu$ L de paraformaldeído 3% (PFA – Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada um dos poços por 20 min a TA (temperatura ambiente). As células foram então lavadas três vezes com água corrente em fluxo baixo e incubadas com solução de cristal violeta por 30 min a TA. Em seguida, as placas foram lavadas novamente em água corrente, três vezes. Após a secagem das placas, as placas de lise foram contadas, sendo que cada placa de lise corresponde a uma unidade viral formadora de placa de lise, desta forma. A contagem é feita a partir da diluição que apresenta no mínimo 10 placas de lise. Este número é adicionado a fórmula do cálculo do título viral (Fórmula 1), juntamente com o volume de inóculo viral utilizado na infecção e com o fator de diluição em que as placas foram contadas. O resultado é expresso por PFU/mL (do inglês, *plaque forming unit*, Unidades Formadoras de Placa/mL).

$$\text{PFU / mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de PFU}}{\mu\text{L de vírus}} \cdot 10^x \text{ (fator de diluição)} \quad (1)$$

### 3.3 IVERMECTINA

A Ivermectina (Sigma-Aldrich, cat. PHR1380-1G, Lote: LRAB3534) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mg/mL (11430  $\mu$ M). A solução foi

aliquotada e estocada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para todos os experimentos descritos a droga foi diluída para a concentração desejada em meio DMEM F-12 completo.

#### 3.4 ELISA *in situ* (Ensaio imunoabsorvente celular *in situ* ligado a enzima)

Células A549 foram semeadas em placa de 96 poços em densidade  $2 \times 10^4$  células/poço. No dia seguinte as células foram pré-tratadas por 4h com diferentes concentrações de IVM. Após as células foram lavadas e infectadas conforme item 3.2.2. Ao término da infecção o sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com metanol: acetona gelado (proporção 1:1), a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1h. Após o fixador foi removido e a placa permaneceu a TA até a total secagem das células. Em seguida o tampão de bloqueio (2% de leite desnatado, 0,05% de Tween-20 em PBS 1X) foi adicionado por 30 min. Após o anticorpo primário 4G2 (anticorpo monoclonal murino contra a proteína E de Flavivirus) diluído em tampão de bloqueio, foi adicionado sobre as células e mantido por 1 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Depois os poços foram lavados quatro vezes com tampão de lavagem (0,01% de Tween-20 em PBS 1X). Em seguida foi adicionado o anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado com HRP (Cell Signaling, 7076), diluído em tampão de bloqueio, e incubado por 1 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após esse tempo, os poços foram lavados quatro vezes com tampão de lavagem e em seguida adicionado o substrato TMB (kit de ELISA eBioscience®) que permaneceu incubado por 10 min no escuro para permitir o desenvolvimento da cor. A reação foi parada com tampão de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M) e a absorbância lida no comprimento de onda de 450 nm na leitora de ELISA BioTek ELX800.

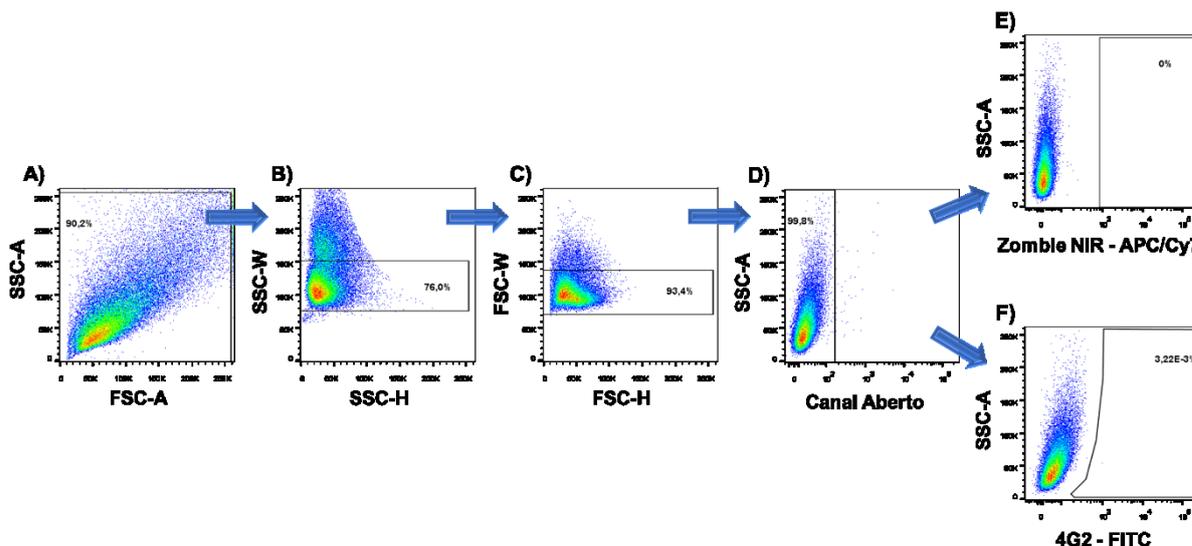
Os dados foram normalizados como % de infecção em relação aos controles, onde foi descontado a Densidade óptica (DO) da amostra “branco” de todas as amostras, seguido de uma regressão linear onde as DOs obtidas nas amostras *mock* foram tomadas como 0% de infecção e as obtidas com as células não tratadas como 100% de infecção. Protocolo adaptado de KOISHI et al. (2012).

#### 3.5 CITOMETRIA DE FLUXO

Células foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, nos quais, foram centrifugadas em  $460 \times g$  por 5 min. O sobrenadante (SBN) foi removido e as células foram suspendidas em tampão fosfato (PBS, 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4). Para células marcadas com PI, análise de viabilidade celular, ele foi adicionado no momento da aquisição no equipamento FACSVerse (BD), sendo as amostras mantidas em gelo até a realização do procedimento. Para as demais amostras, após a remoção do SBN, as células foram novamente centrifugadas em 460 x g por 5 min. Em seguida foram marcadas com Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (BioLegend, cat. 423105) em PBS e incubadas por 20 min/temperatura ambiente/escuro. Após nova lavagem por centrifugação, as células foram fixadas com PFA por 20 minutos, seguido de centrifugação a 460 x g por cinco minutos a 4 °C e incubadas com anticorpo 4G2 conjugado com FITC (fluorocromo isotiocianato de fluoroceína), diluído em saponina 0,25% (Dinâmica®) diluída em FACS buffer (PBS, 1% SFB) por 1 hora a 37 °C. Após adicionou-se PBS e as amostras foram centrifugadas novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em FACS buffer permanecendo em gelo até sua aquisição no equipamento FACSVerse (BD).

A análise dos resultados foi realizada através da criação de estratégias de *gates* utilizando o software FlowJo-VX. Como ilustrado na Figura 6, foram utilizadas células sem adição de moléculas fluorescentes para determinação da referência negativa. Foram retiradas as células acima do limite de detecção para o parâmetro tamanho (FSC, do inglês *Forward Scatter Channel*) e para o parâmetro complexidade (SSC, do inglês *Side Scatter Channel*). A seguir, foram retiradas as células duplas e com autofluorescência. Em seguida foi determinado a positividade das amostras; a amostra utilizada (sem marcação) demonstra a porcentagem de células falso positivas que será descontado das amostras marcadas. Esta estratégia foi utilizada em todos os experimentos de citometria deste trabalho. A área é a quantidade total de fluorescência associada a um evento, a altura é o sinal do pico e a largura é duração do sinal.



**Figura 6. Estratégias de gates para análises de citometria de fluxo.**

A) Configuração dos *gates* a partir das células totais. B) Retirada das células duplas pelo parâmetro de complexidade (SSC) C) Retirada das células duplas pelo tamanho das células (FSC). D) Eliminação de células autofluorescentes. E) *Gate* que representa células positivas para Zombie NIR. F) *Gate* que representa células positivas para 4G2. Estratégia de *gates* feita a partir da célula não marcada.

SSC: Dispersão lateral de luz (complexidade). FSC: Dispersão frontal de luz (tamanho). A: área W: largura (do inglês, *widch*) H: altura (do inglês, *height*) Canal aberto: 448/45 nm.

Fonte: Próprio autor.

### 3.6 MTT

A técnica de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio] mede a viabilidade celular com base no dano induzido nas mitocôndrias. O princípio deste método é a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantificadas pela redução do MTT (um sal de coloração amarela solúvel em água) à formazan (cristais de coloração púrpura, insolúveis em água) (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998; KOISHI et al., 2012). Para tal, células A549 foram semeadas em placas de fundo chato de 96 poços em uma densidade de  $4 \times 10^4$  células/poço, conforme item 3.1. No dia seguinte, as células foram tratadas com 6 concentrações distintas IVM (5, 10, 12,5, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) e seu respectivo veículo, ambos em duplicata, sendo incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 e 36h. Um controle em branco (somente meio) e controle de células (somente células) foram incluídos em todas as placas de ensaio. Após cada intervalo de leitura o sobrenadante foi removido e foram adicionados a cada poço da reação 50  $\mu\text{L}$  de MTT (Amresco®, catálogo 0793) a uma concentração de 0,5mg/mL em meio DMEM F-12 completo em ambiente protegido da luz devido a fotossensibilidade do mesmo. As placas foram cobertas em papel alumínio e mantidas

em estufa por 2h. Passado o período, os cristais de MTT formados foram extraídos adicionando 100 mL de DMSO, após a total dissolução dos mesmos, a leitura diferencial da absorbância foi feita em 550 nm e 630 nm. Ambas as leituras foram realizadas na Multileitora Infinite M200 TECAN.

Os dados foram normalizados seguindo a equação de viabilidade celular (Fórmula 2). Protocolo adaptado de KOISHI et al. (2012).

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{valor da amostra} - \text{controle branco})}{(\text{controle da célula} - \text{controle branco})} \times 100 \quad (2)$$

Após a normalização das amostras, uma curva dose-resposta foi obtida usando uma regressão não linear com ajuste da curva (*Sigmoidal dose-response (variable slope)*), e a concentração citotóxica de 50% (CC50) foi calculada como a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%.

### 3.7 VERMELHO NEUTRO

A técnica de vermelho neutro (NR, do inglês, “*neutrallred*”) mede a viabilidade celular com base na atividade lisossomal. Células viáveis e com lisossomos funcionais, retém o vermelho neutro dentro destas estruturas (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998; KOISHI et al., 2012). Para tanto as células foram semeadas em uma placa de fundo chato de 96 poços em uma densidade de  $4 \times 10^4$  células/poço, conforme item 3.1. No dia seguinte, as células foram tratadas com 6 concentrações distintas IVM (5, 10, 12,5, 25, 50 e 100  $\mu\text{M/mL}$ ) e seu respectivo veículo, ambos em duplicata, sendo incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 e 36h. Um controle em branco (somente meio) e controle de células (somente células) foram incluídos em todas as placas de ensaio. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e o reagente NR a 0,33% em meio DMEM F-12 completo foi adicionado a cada poço, seguido da incubação da placa por 3 h a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após, o meio foi removido e 150 mL de solução extratora (ácido acético 1% e etanol 30%) foi adicionado a cada poço e incubados por 15 minutos sob agitação para extrair o corante NR. Ao término do tempo foi mensurado a absorbância por espectrofotometria a 550 nm na Multileitora Infinite M200 TECAN. As amostras foram normalizadas e a CC50 calculada como descrito no item anterior.

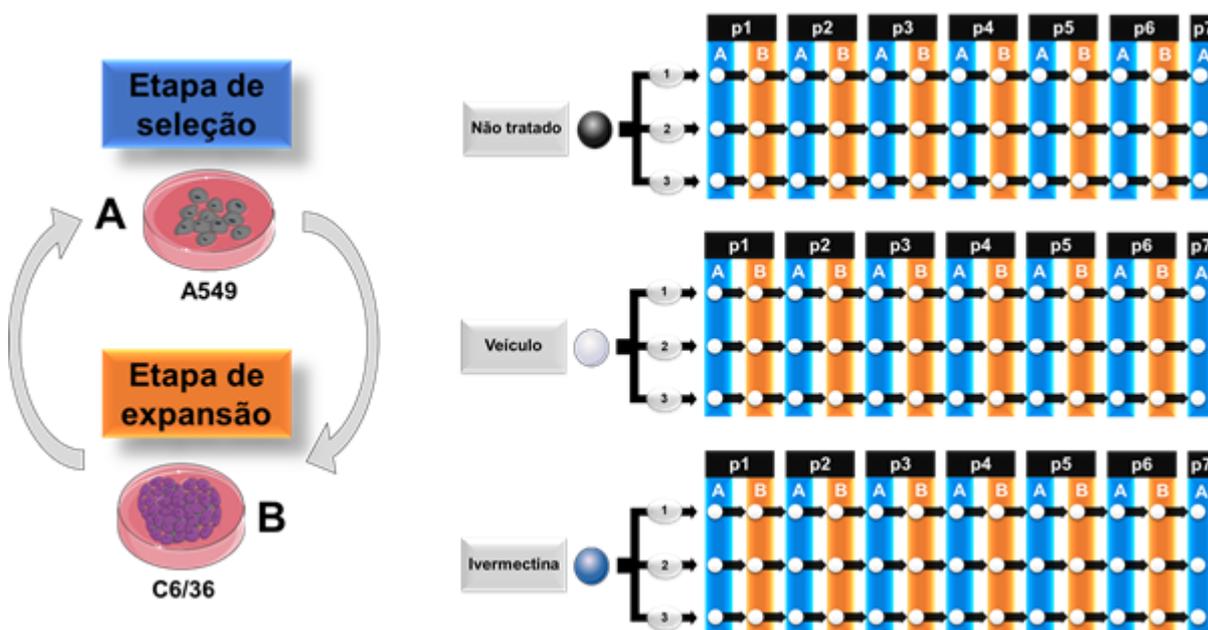
### 3.8 PROTOCOLO DE EVOLUÇÃO DE ZIKV DURANTE MÚLTIPLAS PASSAGENS EM CULTURA CELULAR

Células A549 foram plaqueadas em placa de 6 poços, em triplicatas para cada condição, conforme descrito no item 3.1. No dia seguinte as células foram tratadas durante 4 horas com IVM e/ou veículo (DMSO) diluídos em meio DMEM F-12 completo, conforme protocolo adaptado de Fraser et al. (2014). Após esse período, as células foram lavadas com salina para total remoção da droga. Em seguida as células foram infectadas com ZIKV, conforme item 3.2.2. Ao término do período de absorção foi adicionado 2 mL de meio DMEM F-12 completo e as células levadas a estufa por 36h. Após o tempo de infecção o sobrenadante foi recolhido, identificado e acondicionado em  $-80^{\circ}\text{C}$ . Título viral foi determinado pelo ensaio de placa de lise conforme 3.2.3. Esta etapa do experimento foi chamada de etapa de seleção (p1a, p2a, p3a, p4a, p5a, p6a, p7a), conforme (Figura 7). Após a determinação do título viral foram plaqueadas células C6/36, em placa de 6 poços, em triplicatas para cada condição, conforme item 3.1. a partir do título viral obtido na p1a, calculou-se uma MOI de 0,1. As células C6/36 foram então infectadas com a determinada MOI respeitando sempre a triplicata do experimento anterior (ver esquema na Figura 7). A infecção foi feita conforme item 3.2.2. e infecção foi mantida por 84 h. Ao término do tempo o sobrenadante foi recolhido, identificado e acondicionado em  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram tituladas conforme item 3.2.3 e após a revelação do título viral, esta etapa foi chamada de etapa de expansão (p1b, p2b, p3b, p4b, p5b, p6b). Em seguida o procedimento descrito para a etapa p1a foi repetido, porém o vírus utilizado foi o obtido da passagem anterior. Ao término das 36h o sobrenadante foi recolhido e titulado, sendo esta passagem chamada de p2a. Então foi repetido a etapa p1b, mas utilizando o vírus da etapa anterior e assim sucessivamente, até atingir a passagem p7a (Figura 7).

### 3.9 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os resultados são apresentados pela Média  $\pm$  SEM. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey ou Bonferroni. O nível de significância aceito para os testes foi de  $p < 0,05$ , sendo indicados nas legendas das figuras os graus de significância da seguinte forma: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., São Diego, Califórnia, EUA).



**Figura 7. Esquemas representativos do protocolo de múltiplas passagens de ZIKV.**

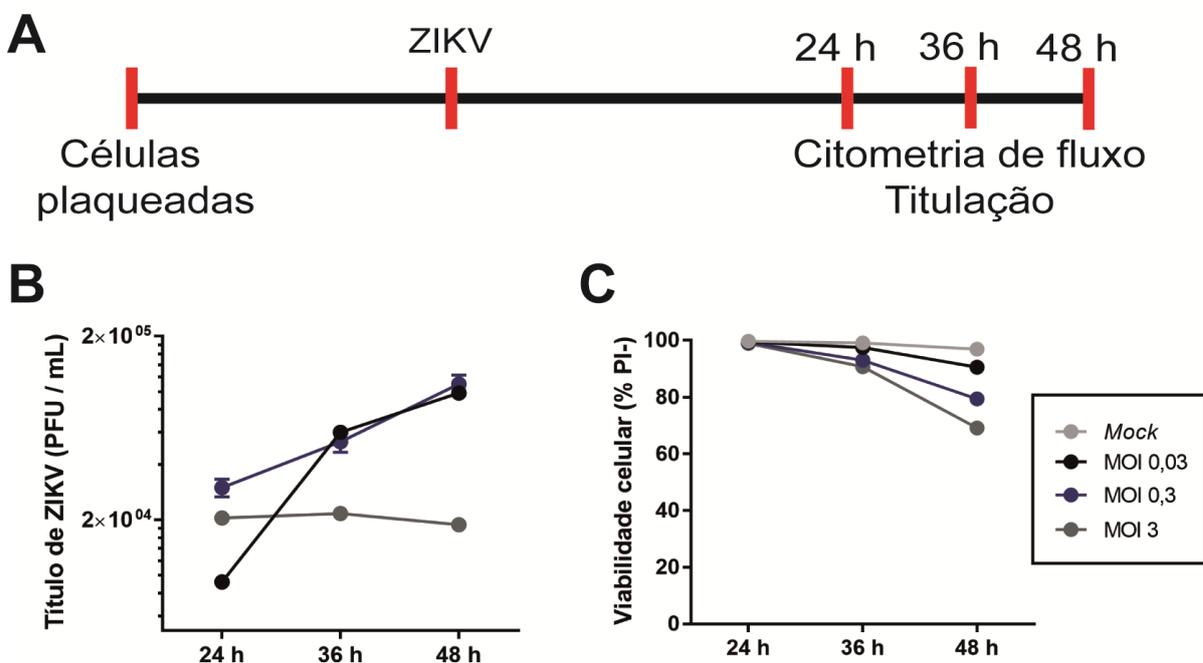
Esquema a direita mostra o ciclo das duas etapas de cada passagem, onde as etapas de seleção foram feitas em células A549 tratadas com IVM e chamada de A, enquanto as etapas de expansão foram feitas e células C6/36 e chamadas de B. Esquema a esquerda mostra que para cada passagem e condição de tratamento foram feitas triplicatas independentes que seguiram sempre na mesma ordem durante as múltiplas passagens.

Fonte: Próprio autor.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CÉLULAS A549 INFECTADAS COM MOI 0,3 DE ZIKV DURANTE 36H NÃO CAUSA MORTE CELULAR

Para determinar a MOI e tempo de infecção de ZIKV nas células A549, foram testadas 9 condições diferentes. A linhagem celular foi infectada com MOI 0,03, 0,3 e 3 durante 24, 36 e 48h (Figura 8A). Ao término de cada tempo de infecção o SBN foi recolhido e posteriormente titulado para determinação do título viral (Figura 8B), enquanto as células foram analisadas com PI por citometria de fluxo para determinação da viabilidade celular (Figura 8C). Baseado no título e na viabilidade celular, foi escolhido utilizar a MOI 0,3 durante 36 h (viabilidade  $93,04 \pm 0,28\%$ , título viral  $5,34 \times 10^4 \pm 6,65 \times 10^3$  PFU/mL) uma vez que em 48h a viabilidade das células cai para  $79,4 \pm 0,7\%$  e trabalhos já demonstraram a capacidade de ZIKV em induzir apoptose em células A549 48 horas pós infecção (hpi) (FRUMENCE et al., 2016; TURPIN et al., 2019).

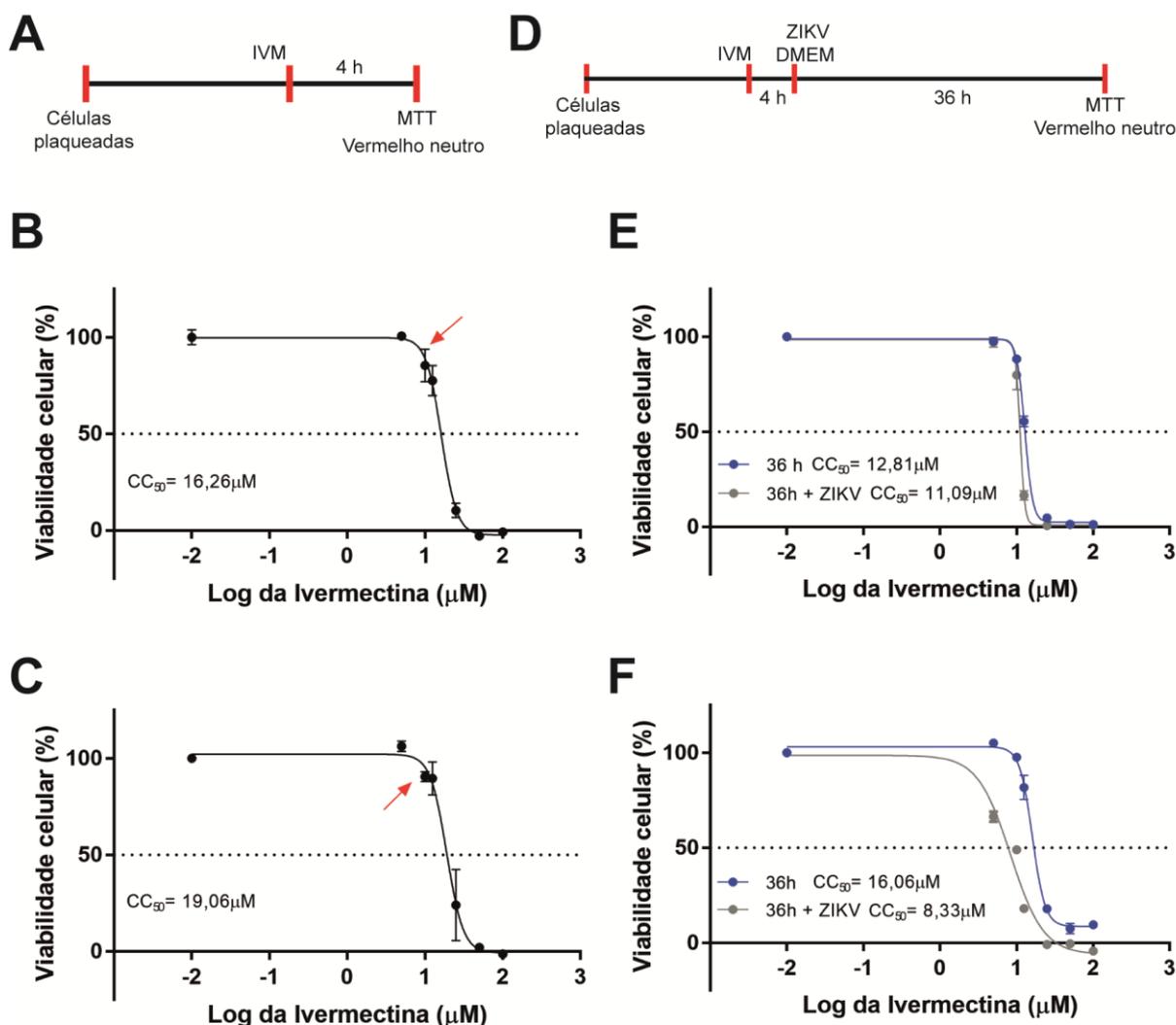


**Figura 8. Determinação da MOI e tempo de infecção do ZIKV em células A549.**

Células A549 infectadas com MOI 0,03, 0,3 e 3 durante 24, 36 e 48h. (A) Esquema do delineamento experimental. (B) Título viral determinado por placa de lise e expresso em Log. (C) Viabilidade celular determinada por PI em Citometria de Fluxo. Resultado é expresso em Porcentagem de células PI negativas (%PI-). Valores obtidos através de um cálculo onde, o valor obtido número de células PI positivas foram descontadas de 100% (valor considerado como todas as células viáveis). Cada ponto representa a Média  $\pm$  SEM da duplicata técnica (n=1).

## 4.2 EFEITO CITOTÓXICO DA IVM EM CÉLULAS A549 OCORRE EM CONCENTRAÇÕES MAIORES DE 10 $\mu$ M

Para testar a capacidade antiviral da IVM, foram analisados primeiramente os efeitos citotóxicos da droga nas células A549 pelo ensaio de MTT e Vermelho Neutro (Figura 9). Para isso, as células foram tratadas com diversas concentrações de IVM (0, 5, 10, 12,5, 25, 50 e 100  $\mu$ M) e com veículo da maior concentração utilizada (DMSO 0,008%). A viabilidade celular foi mensurada por MTT e vermelho neutro para a determinação da CC50 (valores brutos são mostrados na Tabela 1 no ANPÊNDICE A), representadas na Figura 9. Após 4h de tratamento (Figura 9A), a técnica de MTT gerou valores de CC50 de 19,06  $\mu$ M (Figura 9B), enquanto a determinação por vermelho neutro mostrou valores um pouco abaixo, 16,26  $\mu$ M (Figura 9C). Também foi analisada a viabilidade celular depois após as 4h de tratamento, seguida da infecção com ZIKV (curva e símbolos em cinza) ou sem vírus por 36 h (curva e símbolos em azul) (Figura 9 D – F). Sendo a CC50 determinada por MTT de 12,81 e 11,09  $\mu$ M (Figura 9E) e por vermelho neutro 16,06 e 8,33  $\mu$ M (Figura 9F), 36h sem vírus e 36 hpi com ZIKV, respectivamente. A porcentagem de células mortas aumentou no o tratamento com IVM em concentrações superiores a 10 $\mu$ M indicada por setas vermelhas na Figura 9, após 4 h em comparação com as células controle tratadas com DMSO (veículo da droga), o que representa efeitos citotóxicos da droga.



**Figura 9. Citotoxicidade da IVM em células A549.**

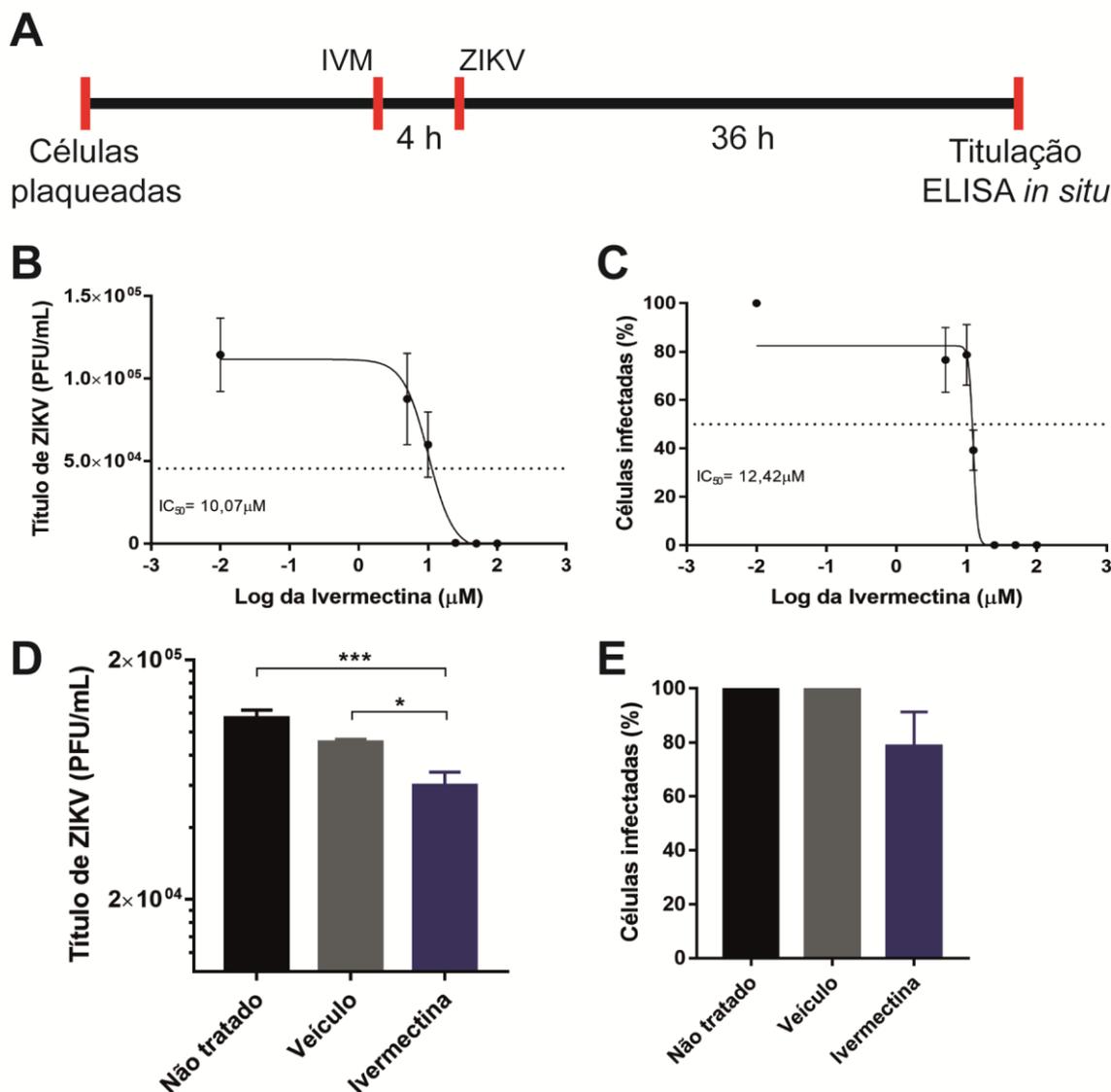
Diferentes concentrações de IVM (0, 5, 10, 12,5, 25, 50 e  $100\mu\text{M}$ ) e veículo na maior concentração foram utilizados. A toxicidade da droga foi avaliada durante 4h de tratamento (A – C), onde (A) mostra o esquema do delineamento experimental enquanto (B – C) as Porcentagens de células vivas analisadas por MTT e Vermelho neutro, respectivamente. Efeitos citotóxicos residuais foram analisados removendo o tratamento após as 4h e infectando as células com ZIKV durante 36h (D – F). (D) mostra o esquema do delineamento experimental enquanto (E – F) as Porcentagens de células vivas analisadas por MTT e Vermelho neutro, respectivamente. Sendo que a linha com símbolos azuis representa células que foram tratadas com IVM e não infectadas durante 36h e a linha com símbolos cinzas para células tratadas por 4h e infectadas com ZIKV por 36h. Os dados foram normalizados conforme a fórmula da viabilidade celular, descrita no item 3.6. A  $CC_{50}$  foi determinada através de uma curva dose-resposta usando uma regressão não linear com ajuste da curva (Sigmoidal dose-response (variable slope)). As setas vermelhas indicam a concentração de  $10\mu\text{M}$ . Os valores mostrados são expressos pela Média  $\pm$  SEM das duplicatas técnicas ( $n=1$ ).

#### 4.3 IVM TEM EFEITO ANTIVIRAL CONTRA ZIKV

A Concentração Inibitória de 50% ( $IC_{50}$ ) da IVM (Figura 10) foi feita a fim de determinar a atividade antiviral da droga contra ZIKV. Para isso, as células A549 foram

pré-tratadas com diversas concentrações de IVM (0, 5, 10, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu$ M) e veículo da maior concentração utilizada (DMSO 0,008%) por 4 horas, seguidas da infecção com MOI 0,3 de ZIKV (Figura 10A). 36 hpi o SBN foi recolhido e titulado por placa de lise (Figura 10B) apresentando uma IC50 de 10,07  $\mu$ M. Em paralelo também foi utilizada técnica de ELISA *in situ* (Figura 10C), que resultou em um IC50 de 12,42  $\mu$ M (valor este próximo do obtido pela titulação).

Visto que a concentração de 10  $\mu$ M apresentou baixa toxicidade para as células durante 4h de tratamento (90,57  $\pm$  2,61% MTT, Figura 9) e também está entre as duas IC50 estabelecidas, ela foi escolhida para ser utilizada nos experimentos posteriores. Em virtude disso as Figura 10D e E destacam os valores isolados para o tratamento com IVM 10 $\mu$ M e veículo, obtidos das curvas do título viral e porcentagem de células infectadas justapostas (Figura 10B e C). É possível observar que nesta condição o título viral foi consideravelmente reduzido na presença da IVM (6 x 10<sup>4</sup>  $\pm$  1 x 10<sup>4</sup> PFU/mL) quando comparado com o não tratado (1,15 x 10<sup>5</sup>  $\pm$  4,24 x 10<sup>3</sup> PFU/mL, p=0,0016) e veículo (9,11 x 10<sup>4</sup>  $\pm$  2,43 x 10<sup>3</sup> PFU/mL, p=0,041). Esta concentração de IVM também foi efetiva em diminuir a porcentagem de células infectadas em 21,31  $\pm$  12,58%.



**Figura 10. Efeitos antivirais da IVM 10µM durante o pré-tratamento.**

Células A549 pré-tratadas com diluições seriadas de IVM (0, 5, 10, 12,5, 25, 50 e 100µM) e veículo da maior concentração utilizada (DMSO 0,008%) por 4h, seguidas da infecção com MOI 0,3 de ZIKV durante 36h. (A) Esquema do delineamento experimental. (B) Título viral obtido por placa de lise (C) ELISA *in situ*. (D) e (E) Valores isolados de (B) e (C) demonstrando a eficiência da IVM 10µM. Os valores de (B) e (D) são expressos em Log e mostram a Média ± SEM (n=3 com duplicatas técnicas), enquanto em (C) e (E) os valores são expressos em % e mostram a Média ± SEM (n=1 com triplicatas técnicas). Os valores demonstrados em (C) e (E) foram normalizados conforme descrito no item 3.4. A análise estatística foi feita comparando todos os tratamentos através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001.

#### 4.4 SETE PASSAGENS SERIADAS DE ZIKV EM CULTURA DE CÉLULAS SÃO SUFICIENTES PARA QUE OCORRA UM DECRESCIMO DO TÍTULO VIRAL

Como demonstrado nos resultados anteriores, o pré-tratamento de células A549 com IVM gera efeitos antivirais sobre o título de ZIKV, corroborando com outros estudos da literatura (BARROWS et al., 2016; LUNDBERG et al., 2013; TAY et al.,

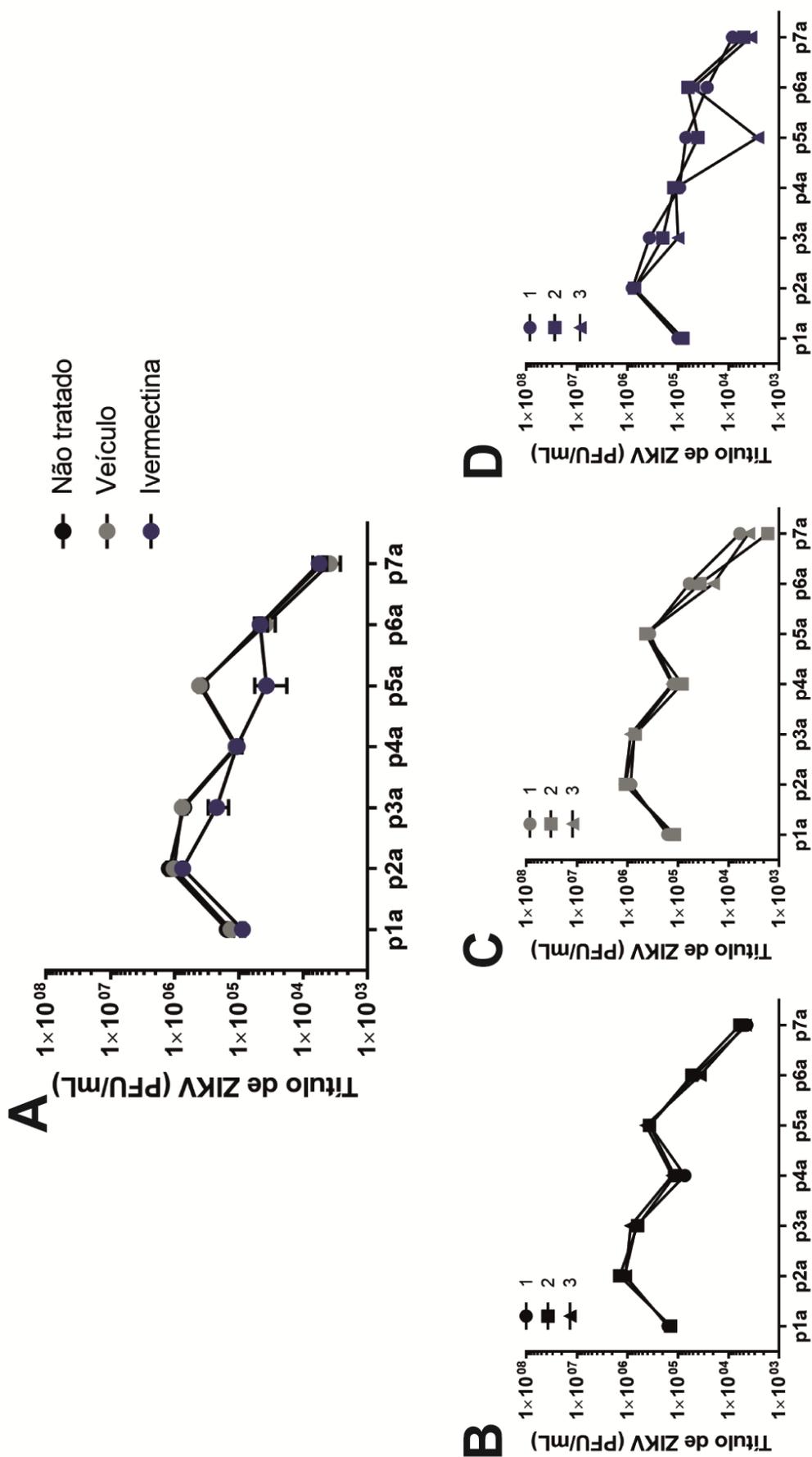
2013). Portanto, com o objetivo de induzir resistência ao tratamento com IVM, a cepa BR15261 de ZIKV foi passada serialmente em células A549 (Figura 11) e C6/36 (Figura 12). Para isso células A549 foram pré-tratadas (ou não) com 10 $\mu$ M de IVM ou veículo (DMSO 0,0004%) por 4h, seguido da infecção com MOI 0,3 de ZIKV por 36h. O SBN oriundo desta passagem sob presença da droga foi titulado e usado como inóculo para infecção de células C6/36, incubadas por 84h. Esta passagem em linhagem de inseto tem o objetivo de expansão viral sem a interferência de citocinas antivirais (notadamente IFN-I) ou droga. Este procedimento foi repetido 7 vezes nas células A549 e 6 vezes em C6/36.

A evolução do título de ZIKV ao longo das passagens foram plotadas separadamente para as linhagens A549 (Figura 11) e C6/36 (Figura 12). Em ambas as figuras, (A) demonstra a evolução do título viral das três replicatas juntas, de cada tratamento, enquanto em (B), (C) e (D) mostra a evolução dos títulos virais de cada replicata e tratamento separadamente. É importante salientar que na primeira passagem do vírus (p1) cada replicata foi identificada e esta ordem foi respeitada nas passagens subsequentes, sendo, portanto, consideradas independentes.

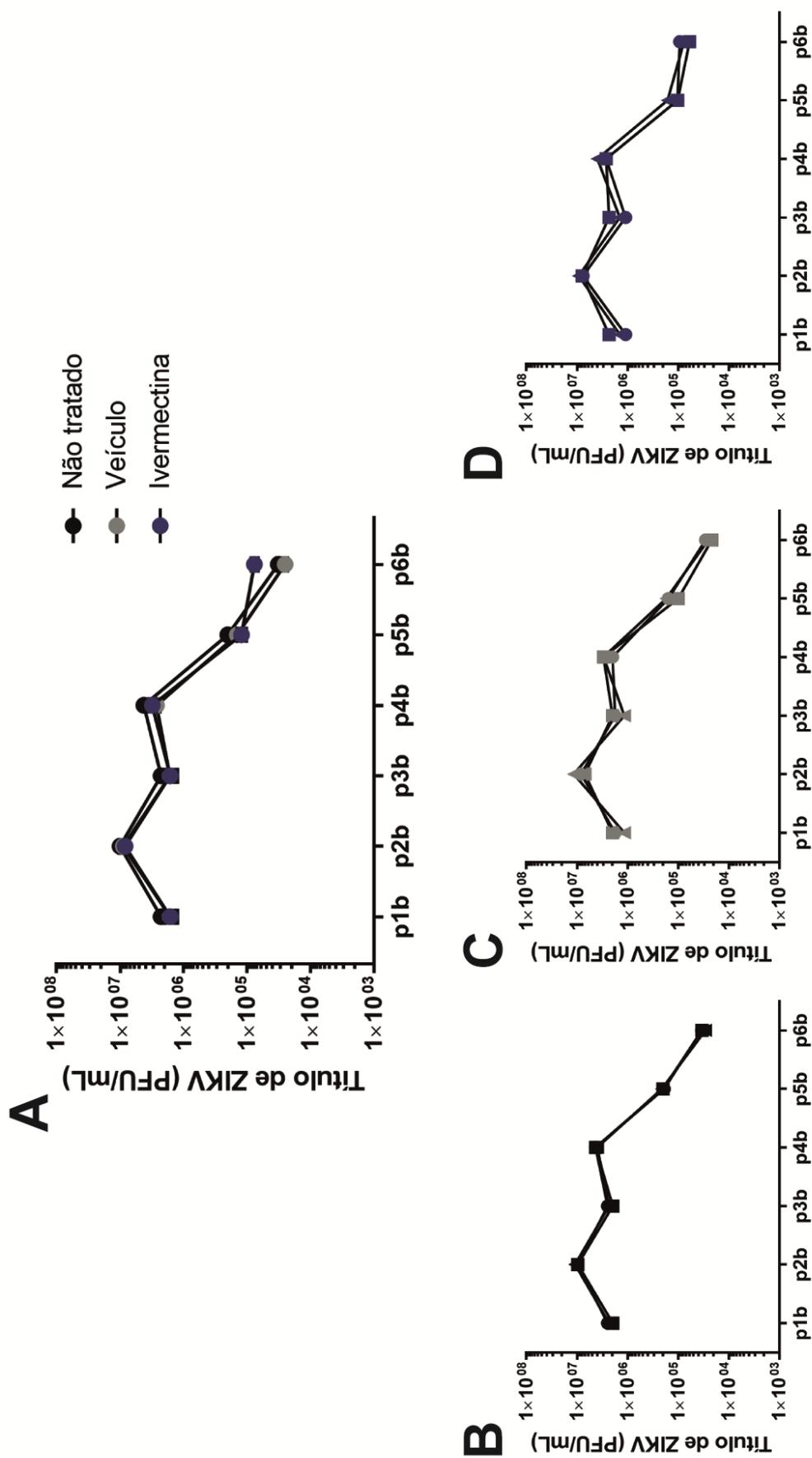
Pode-se observar na Figura 11 que o título das culturas não tratadas (NT) ou tratadas com veículo (V) mantiveram perfis semelhantes ao longo das passagens e com baixa variabilidade entre as replicatas. Por outro lado, o perfil das NT com a IVM destacou-se das outras curvas nas passagens p3a e p5a justamente por apresentarem nesses pontos grande variabilidade entre as replicatas. Na p4a o título viral dos 3 tratamentos ficou muito próximo, nos fornecendo sugestões de que algum tipo de alteração genômica já poderia estar ocorrendo. Entretanto na passagem seguinte, p5a, as NT e V voltaram a ter títulos mais elevados quando comparado com as culturas tratadas com IVM. Mas o título viral da replicata 3 tratada com IVM da p5a, chamou a atenção, pois apresentou um valor de  $2,67 \times 10^3$  PFU/mL, enquanto as outras replicatas do mesmo tratamento se mantiveram entre  $7$  e  $4 \times 10^4$  PFU/mL (Figura 11). No entanto nas passagens subsequentes essa diferença não ocorreu novamente. Na p6a os títulos virais voltaram a se igualar, sendo que o NT ( $4,56 \times 10^4 \pm 4,84 \times 10^3$  PFU/mL) e V ( $3,89 \times 10^4 \pm 1,16 \times 10^4$  PFU/mL) decaíram em torno de 1 log, enquanto as replicatas tratadas com IVM tenderam a um leve aumento em seus títulos ( $4,67 \times 10^4 \pm 1,07 \times 10^4$  PFU/mL), nos sugerindo que o tratamento já não estava mais sendo eficaz e que o vírus provavelmente já havia sofrido algum tipo de adaptação ao ambiente. Fato este que foi confirmado quando a p7a revelou títulos

virais novamente parecidos para ambos os tratamentos (NT:  $5 \times 10^3 \pm 5 \times 10^2$  PFU/mL; V:  $3,89 \times 10^3 \pm 1,25 \times 10^3$  PFU/mL), além dos valores terem decaído mais 1 log, inclusive para os tratados com IVM ( $5,66 \times 10^3 \pm 1,39 \times 10^3$  PFU/mL).

De forma geral a Figura 12 mostra que os títulos virais de ambos os tratamentos não variaram em relação as replicatas, mantendo o mesmo perfil durante todas as passagens. Enquanto que os títulos das culturas anteriormente tratadas com IVM mantiveram-se abaixo dos títulos dos NT e V até a p5b, sendo que na p6b o título das mesmas teve um aumento de  $\pm$  meio log ( $7,66 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^3$  PFU/mL), quando comparado com NT ( $3,24 \times 10^4 \pm 1,72 \times 10^3$  PFU/mL) e V ( $2,52 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$  PFU/mL), nos sugerindo que o processo de indução a resistência poderia estar ocorrendo.



**Figura 11. Evolução do título de ZIKV durante passagens seriadas em células A549 pré-tratadas com IVM.** Passagens seriadas de ZIKV MOI 0,3 durante 36h em células A549 pré-tratadas com 10 $\mu$ M de IVM por 4h. (A) Título viral de ZIKV durante infecção em células não tratadas, tratadas com veículo (DMSO 0,008%) e IVM 10 $\mu$ M. Título viral expresso pela Média  $\pm$  SEM das replicatas técnicas. Título viral de cada replicata técnica e de cada tratamento mostrado em (A). (B) Não tratado - NT (C) Veículo (V) e (D) IVM 10 $\mu$ M. Foram utilizadas 2,5 x 10<sup>5</sup> células/poço de A549.

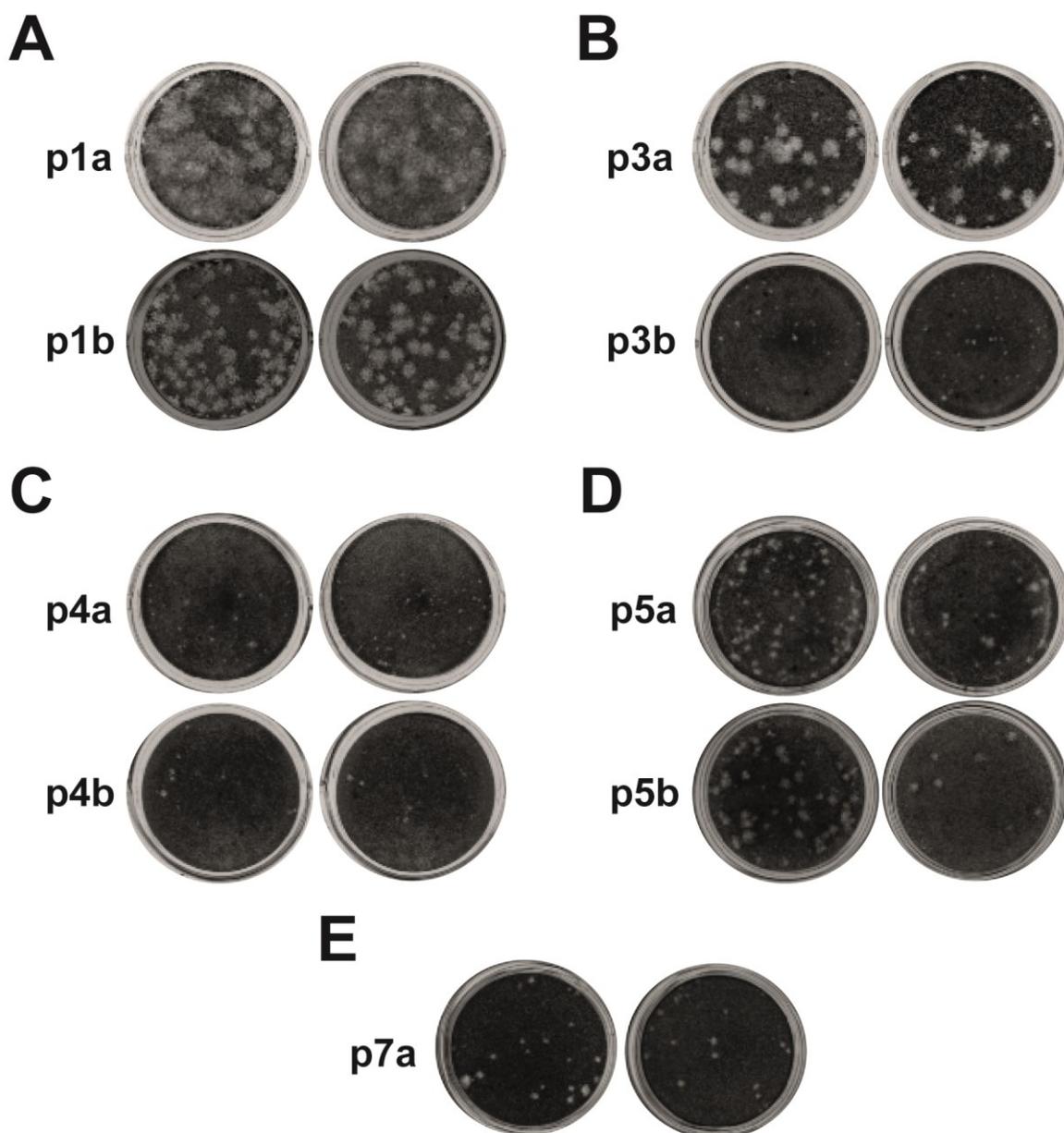


**Figura 12. Evolução do título de ZIKV durante passagens seriadas em células C6/36.**

Passagens seriadas de ZIKV MOI 0,1 durante 84h em células C6/36. (A) Título viral obtido da expansão de ZIKV que passou por células A549 não tratadas, tratadas com veículo (DMSO 0,008%) e IVM 10µM. Título viral expresso pela Média ± SEM das replicatas técnicas. Título viral de cada replicata técnica e de cada tratamento mostrado em (A). (B) Não tratado (C) Veículo e (D) IVM 10µM. utilizadas 1,5 x 10<sup>6</sup> células/poço de A549.

Apesar do protocolo de passagens seriadas ter sido estabelecido com MOI 0,3 para infecção em células A549 e MOI 0,1 para células C6/36, algumas vezes foi necessário a adaptação do mesmo. A julgar que mutações poderiam estar ocorrendo, foi decidido que a maior quantidade possível de SBN como inóculo deveria ser utilizada, não levando em consideração a MOI. Desta forma, a probabilidade de recuperar a provável quasispécie mutante seria mais alta. Um exemplo disso ocorreu na infecção da p3b, onde a MOI de 0,1 não foi atingida nas replicatas 2 e 3 tratadas com IVM (MOIs de cada passagem estão descritas na Tabela 3 em APÊNDICE C). Mas apesar de não ser infectada com a mesma MOI, o título viral das replicatas 2 e 3 tratadas com IVM da p3b atingiram valores próximos das outras amostras (Figura 12). Interessantemente para realização da p4a a MOI de 0,3 foi atingida, já para a p4b todos os tratamentos não atingiram a MOI desejada, sendo que os valores variaram de 0,02 a 0,04. Na p5a os valores de MOI desejados também foram atingidos, assim como as NT e V da p5b. Já as tratadas com IVM variaram de 0,02 a 0,001 na p5b. Entretanto até a p5a os valores de MOI para as células A549, nunca haviam sido modificados, porém na passagem p6a a replicata 2 do V e 1 e 2 da IVM foram infectadas com MOI de 0,2. E dessa vez os títulos virais não foram recuperados, como podemos observar nas Figuras 11 e 12, pois a p6b teve MOIs que variaram de 0,01 a 0,02 enquanto a p7a variou de 0,07 a 0,19 para ambos os tratamentos.

A partir da p3b, além da alteração dos valores de MOI, o tempo de incubação das placas de titulação também precisou ser adaptado. Como se pode observar na Figura 13, até a p3a as placas de lise eram grandes e de fácil contagem, sendo que estas permaneciam incubadas durante 5 dias. Mas na p3b, ao término dos 5 dias de titulação elas passaram a ter cerca de um terço do tamanho observado nas titulações anteriores, sugerindo que uma importante alteração de *fitness* havia ocorrido. A fim de testar se este fenótipo continuaria ocorrendo, a titulação da p4a foi mantida por 5 dias. Como demonstrado na Figura 13 o tamanho das placas de lise revelou-se ainda menor. Em virtude disso, as titulações seguintes foram incubadas por 6 dias, a fim de estas pudessem ficar maiores, diminuindo o risco de erro na hora da contagem. Isso permitiu um sutil aumento no tamanho das placas de lise, mas não ao retorno do tamanho observado nas titulações iniciais.



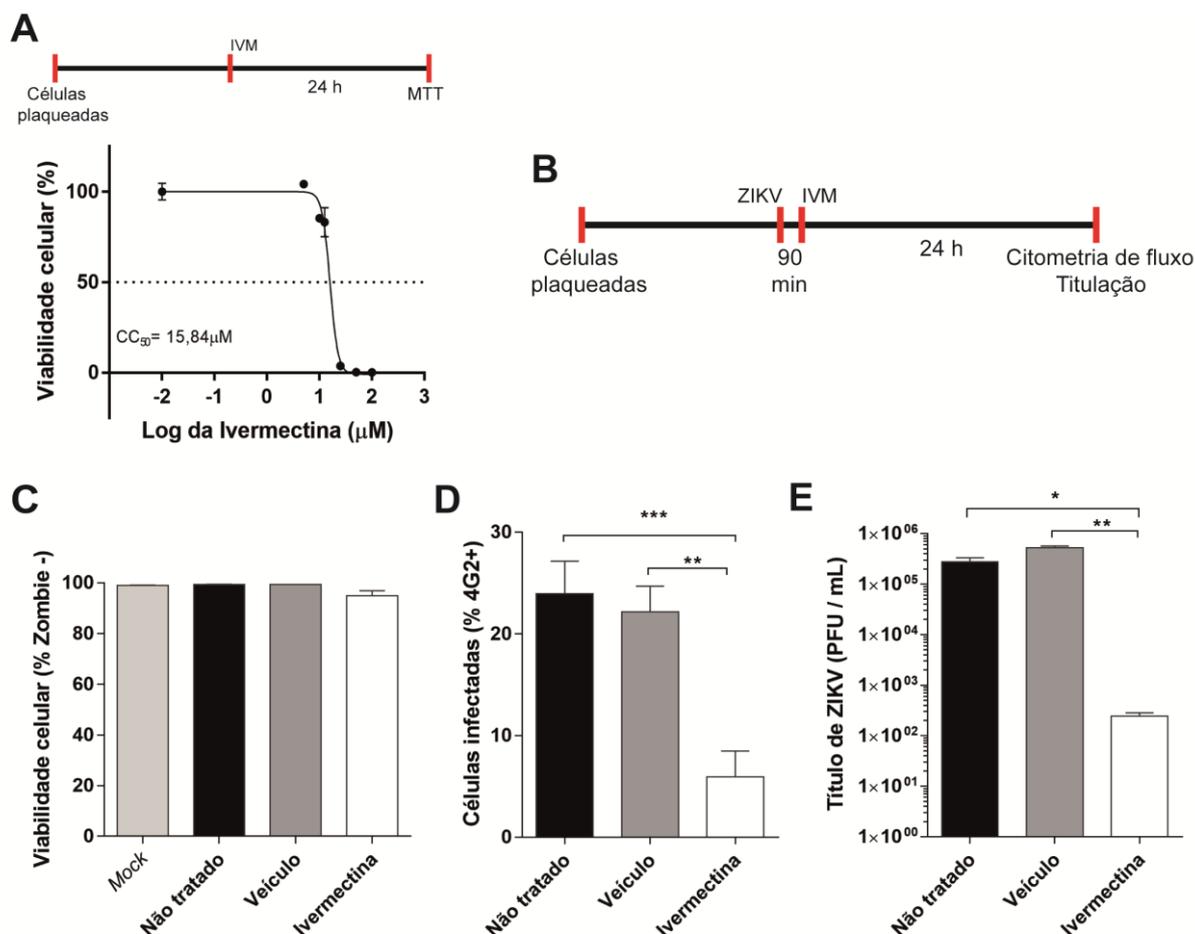
**Figura 13. Imagens representativas das placas de lise formadas durante a titulação das passagens seriadas de ZIKV.**

São mostrados dois poços representativos da titulação por placa de lise da (A) p1, (B) p3, (C) p4, (D) p5 e (E) p7. Imagens capturadas das placas de titulação no aparelho CHIMIDOC.

#### 4.5 PERFIL ANTIVIRAL DA IVM É POTENCIALIZADO DURANTE O TRATAMENTO PROLONGADO

Pensando na utilização da IVM para possíveis terapêuticas anti-ZIKV, foram realizados ensaios utilizando a IVM após o período de adsorção do vírus, sendo a droga mantida em contato com as células durante todo o período de infecção de 24h.

Para isso, foi realizado o ensaio de citotoxicidade pela técnica de MTT, onde as células A549 foram tratadas com diversas concentrações de IVM e veículo (mesmas concentrações utilizadas no pré-tratamento). A Tabela 2 – APÊNDICE B mostra os resultados brutos obtidos, enquanto a Figura 14A mostra a curva de viabilidade com a determinação da CC50 da droga de 15,84 $\mu$ M, sob essas condições. Sendo assim, foi mantida a concentração anteriormente usada de 10 $\mu$ M de IVM para a continuidade dos ensaios. Para os ensaios virais, as células A549 foram infectadas com MOI 0,3 de ZIKV, e após o período de adsorção do vírus foi adicionada a droga ou seu respectivo veículo, sendo mantida a infecção por 24h (Figura 14B). Ao término foi realizado a citometria de fluxo para avaliar a viabilidade celular (Zombie NIR® - Figura 14C) e a porcentagem de células infectadas (4G2+ - Figura 14D), enquanto que o título viral foi quantificado por placa de lise (Figura 14E). Foi observado que a concentração utilizada não altera a viabilidade celular pois os valores obtidos das células infectadas com ZIKV e tratadas com a droga ficaram em 94,9  $\pm$  2,05% enquanto as células *Mock*, não tratadas e tratadas com veículo ficaram entre 99% (99,04  $\pm$  0,11, 99,28  $\pm$  0,18 e 99,27  $\pm$  0,1 respectivamente). A droga foi efetiva em diminuir a porcentagem de células infectadas, tanto quando comparado com NT (23,93  $\pm$  3,23% para 5,94  $\pm$  2,54%; p=0,0006), como com V (22,2  $\pm$  2,55% para 5,94  $\pm$  2,54%; p=0,0014). Esse fenótipo foi repetido também no título viral, onde foi obtido um decréscimo de 3 log comparando NT com a IVM (2,74 x 10<sup>5</sup> para 2,42 x 10<sup>2</sup> PFU/mL).



### Figura 14. Efeito antiviral da IVM pós-infecção.

(A) CC<sub>50</sub> determinada por MTT de células A549 tratadas com diluições seriadas de IVM (0, 5, 10, 12,5, 25, 50 e 100 μM) e veículo da maior concentração utilizada (DMSO 0,008%) por 24h (n=1 com duplicata técnica). (B – E) Células A549 infectadas com MOI 0,3 de ZIKV, seguido de tratamento com IVM 10 μM e seu respectivo veículo por 24h (n=2 com duplicatas técnicas). (B) Esquema do delineamento experimental. (C) viabilidade celular por Zombie NIR® em Citometria de fluxo. A análise estatística foi feita comparando todos contra todos através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. (D) quantidade de células positivas para 4G2. A análise estatística foi feita comparando as células não tratadas, tratadas com veículo e/ou IVM através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. (E) Título viral por placa de lise. A análise estatística foi feita comparando a média das replicatas técnicas das 2 replicatas biológicas através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. Todos os valores são expressos pela Média ± SEM.

## 5 DISCUSSÃO

As recentes epidemias causadas pelo ZIKV geraram sérios problemas de saúde pública por todo o mundo. Não somente pelo grande potencial de disseminação e de infecção em humanos, mas também por sua capacidade de desencadear doenças com alto grau de morbidade e mortalidade (FARIA et al., 2016; MASSAD et al., 2017; METSKY et al., 2017; WEAVER et al., 2017). Porém até o momento, não há vacina preventiva ou tratamento eficaz contra esse patógeno emergente (FERNANDEZ; DIAMOND, 2017; MCARTHUR, 2017). Em virtude disso a busca por drogas que possam ser utilizadas como antiviral é crescente e um caminho rápido para identificar candidatos à terapêutica anti-ZIKV é redirecionar medicamentos previamente aprovados (BARROWS et al., 2016; SAXENA et al., 2016). Um exemplo disso é a IVM que está em estudo clínico em humanos para tratar infecções causadas por DENV e se mostra promissora também para tratar infecções com outros flavivírus, inclusive ZIKV (BARROWS et al., 2016; U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE., 2015). Tendo em vista o possível uso da IVM como antiviral contra ZIKV esse trabalho propôs um protocolo de evolução viral em células que simule pressões de seleção suficientes para prever mutações sobre o vírus, o que levaria falha do tratamento a longo prazo.

Para isso foram utilizadas células A549, que são células epiteliais comumente utilizadas para infecções virais *in vitro* por serem permissíveis a infecção e mimetizarem a primeira barreira encontrada pelos vírus para infectar humanos (KNIPE; HOWLEY, 2013; KUMAR et al., 2016; SUDEEP; PRATIK B. VYAS; SHIL., 2019). Mas durante a infecção essas células produzem citocinas antivirais, como por exemplo o IFN (SHAILY; UPADHYA, 2019), que são secretadas para o meio extracelular juntamente com os vírus produzidos. Portanto se utilizarmos o SBN desta cultura para infectar novamente a mesma linhagem celular, as citocinas antivirais presentes no inóculo juntamente com as citocinas que serão produzidas pela cultura nova, conseguem conter a infecção viral, limitando passagens sucessivas. Para contornar este problema foram estabelecidas passagens de expansão viral utilizando células C6/36, que são células de um dos mosquitos vetores do vírus, *Aedes albopictus*. Nesse sentido, foi optado por não tratar as células C6/36 com IVM, permitindo que os vírus pudessem proliferar sem nenhuma interferência. Mimetizando basicamente o que acontece *in vivo*, onde as células humanas são infectadas com o

vírus, que posteriormente entram em contato com drogas e podem retornar a infectar e proliferar nas células do vetor, reiniciando o ciclo de transmissão.

A definição da MOI, tempo de infecção e protocolo de tratamento da IVM em células A549 foi baseada em três estudos: (i) Tay et al. (2013), que utiliza células BHK-21 (células de renais de hamster bebê) pré-tratadas com IVM seguidas da infecção com MOI de 0,3 de DENV por 48h; (ii) Wagstaff et al. (2012), que usa células Vero pré-tratadas com IVM por 4h, seguidas da infecção com MOI 4 de DENV2 e mantida até 72h; e (iii) Fraser et al. (2014) que utiliza células Vero, tratadas por 3h com a IVM, seguidas da infecção com MOI 4 de DENV2 por 24h. Já as condições de infecção da linhagem C6/36 com MOI de 0,1 por 84h já havia sido anteriormente padronizada no laboratório (dados não mostrados) também baseado em protocolo de Fraser et al. (2014).

A escolha das concentrações de IVM testadas tanto nos ensaios de citotoxicidade como nos ensaios de atividade antiviral, foram baseados nos estudos de Barrow et al. (2016), Tay et al. 2013 e Wagstaff et al. (2012). Assim como demonstrado por Barrows et al. (2016), 10 $\mu$ M de IVM não apresentou efeitos citotóxicos consideráveis e diminui o título viral de ZIKV frente ao pré-tratamento das células. Estudos indicam que os efeitos citotóxicos da IVM ocorrem devido a droga afetar as funções das mitocôndrias e lisossomos celulares (MOLINARI et al., 2009; ZHANG et al., 2019). Mas isso é concentração e linhagem celular dependente, visto que já foram utilizadas concentrações de 25 e 50 $\mu$ M em células Vero e 150  $\mu$ M em células HeLa (Célula epitelial humana de adenocarcinoma de colo de útero) (FRASER et al., 2014; WAGSTAFF et al., 2012). Estas informações podem justificar os resultados de citotoxicidade apresentados neste trabalho uma vez que MTT analisa a viabilidade celular pela integridade das desidrogenases mitocondriais enquanto o vermelho neutro a integridade dos lisossomos (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998). O deslocamento da curva de citotoxicidade gerado pelas células infectadas posterior ao tratamento com a IVM (Figura 9 C – D), pode ser explicado pelo fato de que o efeito citopático característico da apoptose, gerado durante a infecção viral é retardada durante a infecção com ZIKV, onde as efeitos típicos começam a aparecer 48 hpi (LI et al., 2016; TURPIN et al., 2019).

Durante a replicação dos vírus de RNA é comum que alterações genômicas ocorram, causando alterações no *fitness* e na infectividade viral, sendo que protocolos de sucessivas transferências entre células se mostram efetivos para o estudo deste

fenômeno (DOMINGO; PERALES, 2019). De fato, os resultados aqui apresentados sugerem que o *fitness* viral possa ter sofrido alterações nas primeiras passagens, pois além de alterações fenotípicas no tamanho da placa de lise durante a titulação, os títulos virais de ambos os tratamentos caíram na p3b (Figura 12). Apesar dessa hipótese só poder ser confirmada com experimentos específicos para avaliar esse parâmetro, já se sabe que durante passagens seriadas o *fitness* viral atinge um valor crítico, chegando a um platô (NOVELLA et al., 1995b). Conforme a teoria estabelecida por Eigen, esse fenômeno indica que a população tenderá a entrar em erro catástrofe (EIGEN, 2002; MANRUBIA; DOMINGO; LÁZARO, 2010). Fazendo com que as quasispécies reduzam seu *fitness*, visando que as mutações deletérias geradas não levem a extinção da população, uma vez que além dos altos títulos a taxa de mutação da população também é elevada. Esta queda estaria relacionada ao aparecimento de novas cepas na população em um processo aleatório no qual os indivíduos com maior *fitness* são perdidos, para que os de menor repliquem-se (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012). Apesar disso, o platô é seguido por nova fase de crescimento exponencial do *fitness* da população se há manutenção das condições ambientais (de pressão de seleção).

Diante do exposto acima pode-se sugerir que o platô de replicação atingiu seu limite na p5a, e que durante a p5b possa ter ocorrido a perda das quasispécies com maior *fitness* da população, uma vez que os títulos começaram a decair a partir desta passagem. Desta forma, os títulos decrescentes observados até a p7a aconteceriam em função da adaptação das quasispécies de menor *fitness* (ANDERSSON; HUGHES, 1996; NOVELLA et al., 1995a). Neste contexto, o maior título observado na p6b para os vírus que receberam IVM sugere mudança no perfil da replicação dessas populações. Não é possível afirmar que seja resistência, pois nas culturas com células C6/36 os vírus não recebem a droga. No entanto, o que pode estar ocorrendo é que os vírus sobreviventes ao tratamento da passagem anterior possam estar apresentando uma capacidade de replicação mais alta nas células de mosquito. Este fenômeno seria mais dificilmente observado durante a replicação em célula A549, devido a maior pressão de seleção deste sistema e, por isso, a p7a ainda apresenta diminuição dos títulos

Conforme Coffey et al. (2011) e Vignuzzi et al. (2006), os principais desafios para a sobrevivência de uma espécie viral ocorrem durante as interações com os diferentes hospedeiros, sendo então necessário o equilíbrio entre a fidelidade da

replicação e a variabilidade genômica. Isso garante que a transmissão da composição genética aconteça mesmo durante a construção de um reservatório de mutantes individuais, facilitando a adaptação aos diferentes ambientes encontrados durante a infecção. Apoiando isso, Filomatori et al. (2017) isolaram uma cepa mutante de DENV a partir de células de mosquitos que apresentaram uma menor capacidade de superar a resposta antiviral quando este foi utilizado para infectar células humanas. Este achado apoia a ideia de que durante a transição entre as diferentes espécies possa ocorrer a perda de algumas de suas quasispécies, que deixam o vírus mais sucessível à resposta antiviral da célula humana. Isso sugere que durante a transição da p6b para a p7a, esse mesmo fenômeno possa ter ocorrido.

Estudos com WNV, outro membro da família *Flavivirus* sugerem que a replicação alternada restringe a evolução e prevê que quanto maior for a replicação no vetor invertebrado, menor será a capacidade de replicação no hospedeiro vertebrado (CIOTA et al., 2007a, 2007b, 2007c). Informações estas que podem justificar as oscilações dos títulos virais obtidos durante o protocolo de múltiplas passagens, sendo que os valores mostrados em p2b, p3a, p4b e p5a, refletem fortemente isso. Contrastando com estudos realizados com VSV, onde os autores sugerem que a evolução dos arbovírus não é restringida por ambientes celulares alternados e, ao contrário, que as populações de vírus são generalistas podendo replicar-se em ambientes celulares díspares indistinguíveis (NOVELLA et al., 1999).

As mutações ocorrem inevitavelmente sempre que um vírus RNA se replica, inclusive no curso da formação de placas de lise durante as sucessivas passagens. Isso ocorre pois o processo de seleção resgata apenas uma minoria em meio as quasispécies que perderam a capacidade de formar uma placa. A geração de uma placa de lise envolve a replicação do vírus em uma célula inicial, seguida pela disseminação da progênie viral para as células vizinhas da monocamada até que os recursos se esgotem, o vírus seja inativado ou o desenvolvimento da placa interrompido (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012). Corroborando, os nossos dados de tamanho reduzido das placas de lise das titulações, a literatura traz um estudo realizado por Escarmís et al. (2008) com o vírus causador da febre aftosa. Este foi submetido a diversas passagens na cultura de células BHK-21, sendo que na p190 até a 409 os clones passaram a apresentar um fenótipo não citolítico, ou seja, não produzindo placas de lise. Mas que apesar de reduzirem em torno de 140 vezes a sua infectividade quando comparado com os clones selvagens, continuavam

competentes na replicação do RNA e estabeleciam uma infecção persistente na cultura de células. O grupo relatou também que estes apresentavam algumas mutações em regiões genômicas que afetam a capacidade do vírus de matar células BHK-21 (ESCARMÍS et al., 2008). Outro estudo que teve resultados parecidos, foi o realizado por Halstead e Marchette (2003) com sete cepas diferentes de DENV em cultura de células primárias que resultou em placas menores nas células LLC-MK2 (Células epiteliais do rim de macaco Rhesus) e ausência de formação destas em células GMK (células primárias de rim de macaco verde africano) (HALSTEAD; MARCHETTE, 2003).

Até o momento a única informação disponível sobre a indução de resistência à IVM em vírus é um estudo não publicado, apenas comentado no estudo de Mastrangelo et al. (2012), que visou fornecer uma prova independente de que a atividade antiviral da IVM seria por inibição da NS3 helicase. Para tal, tentou-se selecionar variantes de YFV resistentes a IVM através da passagem em série sob concentrações crescentes da droga. Mas mesmo após 30 passagens em série de YFV na presença de IVM, o grupo não teve sucesso em conseguir um vírus resistente a droga mesmo variando a MOI, concentração da droga e tipo de célula hospedeira. Eles sugerem que a barreira à resistência é alta e que os mutantes podem não surgir porque podem não ser viáveis. Porém a ausência de uma publicação final deste estudo inviabiliza maior compreensão dos dados gerados.

Por fim, o presente estudo apresenta limitações como a falta do sequenciamento genômico dos vírus gerados após as passagens. Este será realizado por técnica de larga escala uma vez finalizadas as 10 passagens previamente determinadas. Outra limitação é a utilização de uma única cepa para o estudo. A obtenção de resultados semelhantes com cepas diferentes pode aumentar a robustez dos achados. A robustez dos dados também pode ser aumentada com um uso maior de replicatas. Apesar disso os resultados gerados neste trabalho de perfil de citotoxicidade e de efeito antiviral da IVM sobre o ZIKV estão em conformidade com outros resultados presentes na literatura (KETKAR et al., 2019; NG et al., 2019; WANG et al., 2017b). E, além disso, o protocolo de passagens virais aqui padronizado e demais dados do uso da IVM em nosso sistema será útil para a realização de novos ensaios que visem explorar o uso da IVM como tratamento para ZIKV e/ou outros *Flavivirus*.

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a CC50 da ivermectina em A549 é de 17 $\mu$ M. Assim como já demonstrado na literatura, o pré-tratamento com IVM apresenta atividade antiviral contra ZIKV. Mas quando utilizada como pós-tratamento esse efeito é potencializado. Apesar disso, os resultados aqui apresentados fornecem informações adicionais e promissoras para o desenvolvimento de mais estudos que visem o uso desta droga como terapêutica pra infecções com ZIKV.

Não é possível afirmar que o ZIKV adquiriu resistência a IVM, mas uma das replicatas das células tratadas com IVM (3 – p3a e p5a) apresentou alteração no processo evolutivo.

## 7 PERSPECTIVAS

Apesar das incessantes tentativas para que este estudo fosse concluído, em virtude do curto tempo e dos inúmeros imprevistos ocorridos, isso não foi possível. Portanto visando o seu término, as próximas etapas consistem em:

- Continuar as passagens seriadas do processo de indução de resistência até a 10<sup>a</sup> passagem, visto que esse era o projeto inicial;
- Realizar o sequenciamento dos vírus obtidos nas passagens que apresentaram algum tipo de alteração fenotípica, a fim de analisar alterações que possam ter ocorrido nos genomas virais;
- Executar experimentos de competição do vírus selvagens com os possíveis vírus mutantes, com objetivo de analisar e quantificar o fitness viral;

Portanto ao término do trabalho teremos um modelo para estudo da evolução dos vírus RNA que terá a representação dos genomas de cada partícula viral da quasispécie. Fornecendo a sequências de nucleotídeos ou aminoácidos e eventuais substituições de base destes genomas. Além de informações sobre a capacidade replicativa e outras características fenotípicas da população viral.

Julgando que esse trabalho gerou uma quantidade de dados que permitem a realização de mais estudos e considerando meu interesse em continuá-lo durante o doutorado, abaixo são citadas abordagens que poderão ser realizadas.

- Repetir o processo de indução de resistência com DENV e com outras cepas clínicas de ZIKV, visto que nosso laboratório conta com 3 cepas de DENV e mais duas outras cepas clínicas de ZIKV;
- Realizar o processo de indução de resistência utilizando células A549 *knockout* (deficientes para um ou mais genes), uma vez que nosso laboratório dispõe de células deficientes para genes importantes da resposta antiviral celular.
- Utilizar os vírus obtidos para infectar mosquitos visando analisar a influência das mutações e alterações de *fitness in vivo*, no organismo vetor;
- Submeter cepas de ZIKV e DENV a esse mesmo protocolo utilizando a IVM combinada com outras drogas com potenciais efeitos antivirais;
- Testar concentrações menores de IVM, visando níveis que possam ser utilizados terapeuticamente em humanos;

- Compilar todos os dados em uma biblioteca online, permitindo que resultados de outros estudos e grupos sejam anexados. Fornecendo assim uma ferramenta de suporte para a escolha e padronização de terapêuticas novas ou até mesmo para as já existentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRELLI, A. et al. Mutational landscape of Zika virus strains worldwide and its structural impact on proteins. **Gene**, v. 708, n. April, p. 57–62, 2019.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Muller's ratchet decreases fitness of a DNA-based microbe. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 2, p. 906–907, 23 jan. 1996.
- APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 9, p. 134–142, 2014.
- ARIAS, A. et al. Fitness increase of memory genomes in a viral quasispecies. **Journal of Molecular Biology**, v. 339, n. 2, p. 405–412, 28 maio 2004.
- ARIAS, A. et al. Molecular dissection of a viral quasispecies under mutagenic treatment: positive correlation between fitness loss and mutational load. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 817–830, 2013.
- BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, n. 7, p. 1684–1688, 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, p. 259–270, 2016.
- BASSI, M. R. et al. Extinction of zika virus and usutu virus by lethal mutagenesis reveals different patterns of sensitivity to three mutagenic drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, 1 set. 2018.
- BIDET, K.; GARCIA-BLANCO, M. A. Flaviviral RNA structures and their role in replication and immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1062, p. 45–62, 2018.
- BROOKS, A. J. et al. The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin  $\beta$ 1 and importin  $\alpha/\beta$ -recognized nuclear localization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36399–36407, 27 set. 2002.
- BULLARD-FEIBELMANA, K. M. et al. The FDA-approved Drug Sofosbuvir Inhibits Zika Virus Infection HHS Public Access. **Antiviral Res.**, v. 137, p. 134–140, 2017.
- CAMPBELL, W. C. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 853–65, 2012.
- CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1084–1086, jun. 2014.
- CHABALA, J. C. et al. Ivermectin, a New Broad-Spectrum Antiparasitic Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1134–1136, 1980.

CHACCOUR, C. J. et al. Ivermectin to reduce malaria transmission: A research agenda for a promising new tool for elimination. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 153, 2013.

CHAMBERS, T. J. et al. FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. **Microbiol**, v. 44, p. 649–688, 1990.

CHAUDHARY, V. et al. Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. **Journal of Virology**, v. 91, n. 14, p. 1–17, 2017.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in Vitro**, v. 12, n. 3, p. 251–258, 1 jun. 1998.

CIOTA, A. T. et al. Cell-specific adaptation of two flaviviruses following serial passage in mosquito cell culture. **Virology**, v. 357, n. 2, p. 165–174, 20 jan. 2007a.

CIOTA, A. T. et al. Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 3, p. 865–874, mar. 2007b.

CIOTA, A. T. et al. Adaptation of two flaviviruses results in differences in genetic heterogeneity and virus adaptability. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2398–2406, set. 2007c.

COFFEY, L. L. et al. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 38, p. 16038–16043, 20 out. 2011.

COSTELLO, A. et al. Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 6, p. 406- 406A, 1 jun. 2016.

CROCI, R. et al. Liposomal Systems as Nanocarriers for the Antiviral Agent Ivermectin. **International Journal of Biomaterials**, v. 2016, 2016.

CROTTY, S.; CAMERON, C. E.; ANDINO, R. RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 12, p. 6895–6900, 2001.

CRUMP, A.; OMURA, S. Ivermectin, ‘Wonder drug’ from Japan: the human use perspective. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 87, n. 2, p. 13–28, 2011.

DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.

DE LA HIGUERA, I. et al. Molecular and functional bases of selection against a mutation bias in an RNA virus. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 1212–1228, 2017.

DECKARD, D. T. et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 14, p. 372–374, 15 abr. 2016.

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, p. 509–520, 1952.

DOMINGO, E. Genetic variation and quasi-species. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 2, n. 1, p. 61–63, 1992.

DOMINGO, E. et al. Basic concepts in RNA virus evolution. **FASEB J.**, p. 859–64, 1996.

DOMINGO, E. Rna Virus Mutations. **Annual review of microbiology**, v. 51, p. 151–178, 1997.

DOMINGO, E. et al. Quasispecies Structure and Persistence of RNA Viruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 8, p. 521–7, 1998.

DOMINGO, E. et al. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. **Virus Research**, v. 107, n. 2, p. 129–139, 2005.

DOMINGO, E. et al. Viruses as quasispecies: Biological implications. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 299, p. 51–82, 2006.

DOMINGO, E. et al. Viral fitness: History and relevance for viral pathogenesis and antiviral interventions. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 2, 2019.

DOMINGO, E.; PERALES, C. Viral quasispecies. **PLoS Genetics**, v. 15, n. 10, 2019.

DOMINGO, E.; SHELDON, J.; PERALES, C. Viral Quasispecies Evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 159–216, 1 jun. 2012.

DONG, S.; KANG, S.; DIMOPOULOS, G. Identification of anti-flaviviral drugs with mosquitocidal and anti-Zika virus activity in *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007681, 2019.

DUAN, Y. et al. Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerase Interacts with Genome UTRs and Viral Proteins to Facilitate Flavivirus RNA Replication -Review. **Viruses**, v. 11, n. 929, p. 14, 2019.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

EIGEN, M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. **Die Naturwissenschaften**, v. 58, n. 10, p. 465–523, 1971.

EIGEN, M. Catástrofe de erro e estratégia antiviral. **Anais da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América**, v. 99, n. 21, p. 13374–1337, 2002.

EIGEN, M.; SCHUSTER, P. Stages of emerging life--five principles of early organization. **Journal of molecular evolution**, v. 19, n. 1, p. 47–61, 1982.

ESCARMÍS, C. et al. Repeated Bottleneck Transfers Can Lead to Non-cytocidal Forms of a Cytopathic Virus: Implications for Viral Extinction. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 2, p. 367–379, 15 fev. 2008.

FARIA, N. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 349–353, 2016.

FAYE, O. et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 96–101, 2008.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FERNANDEZ, E.; DIAMOND, M. S. Vaccination Strategies against Zika virus. **Current Opinion in Virology**, v. 23, p. 59–67, 2017.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FRASER, J. E. et al. Investigating Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Nuclear Import. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 2014.

FREIRE, C. C. DE M. et al. Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. v. 2015, n. August, p. 1–8, 2015.

FRUMENCE, E. et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- $\beta$  production and apoptosis induction. **Virology**, v. 493, p. 217–226, 1 jun. 2016.

GALLEGO, I. et al. Resistance of high fitness hepatitis C virus to lethal mutagenesis. **Virology**, v. 523, n. June, p. 100–109, 2018.

GAO, Y. et al. Identification of Novel Natural Products as Effective and Broad-Spectrum Anti-Zika Virus Inhibitors. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1–18, 2019.

GÖERTZ, G. P. et al. **Functional RNA during Zika virus infection** **Virus Research** Elsevier B.V., , 2 ago. 2018.

GREEN, A. M. et al. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 6, p. 1148–1160, 2014.

GREGORI, J. et al. Viral quasispecies complexity measures. **Virology**, v. 493, p. 227–237, 2016.

GREGORY, C. J. et al. Modes of Transmission of Zika Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. S875–S883, 2017.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.

HALSTEAD, S. B.; MARCHETTE, N. J. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 6 Suppl, p. 5–11, 1 dez. 2003.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 1 set. 2015.

HAYES, E. B. **Zika virus outside Africa** **Emerging Infectious Diseases**, set. 2009.

JANS, D. A.; MARTIN, A. J. Nucleocytoplasmic Trafficking of Dengue Non-structural Protein 5 as a Target for Antivirals. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1062, p. 165–173, 2018.

JANS, D. A.; MARTIN, A. J.; WAGSTAFF, K. M. Inhibitors of nuclear transport. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 58, p. 50–60, 1 jun. 2019.

JAVED, F. et al. Zika virus: what we need to know? **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 3–16, jan. 2018.

KAPOOR, M. et al. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 32, p. 19100–19106, 1995.

KAUTZ, T. F.; FORRESTER, N. L. RNA Virus Fidelity Mutants: A Useful Tool for Evolutionary Biology or a Complex Challenge? **Viruses**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2018.

KETKAR, H. et al. Lack of efficacy of Ivermectin for prevention of a lethal Zika virus infection in a murine system. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 10–12, 2019.

KHOU, C.; PARDIGON, N. Identifying Attenuating Mutations: Tools for a New Vaccine Design against Flaviviruses. **Intervirology**, v. 60, n. 1–2, p. 8–18, 2017.

KIM, J. A. et al. Favipiravir and ribavirin inhibit replication of Asian and African strains of zika virus in different cell models. **Viruses**, v. 10, n. 2, 9 fev. 2018.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **FIELDS VIROLOGY 6 Edition**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2013. v. 53

KOISHI, A. C. et al. Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an In Situ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

KOSYNA, F. K. et al. The importin  $\alpha/\beta$ -specific inhibitor Ivermectin affects HIF-dependent hypoxia response pathways. **Biological Chemistry**, v. 396, n. 12, p. 1357–1367, 2015.

KRAUER, F. et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. **PLoS Medicine**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2017.

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

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, p. 1232–1239, ago. 2008.

LAURING, A. S.; ANDINO, R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. 1–8, jul. 2010.

LI, H. et al. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 593–98, 2016.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: **Fields Virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2006.

LING YUAN et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 358, n. 6365, 2017.

LIU, F. et al. Evolutionary characteristics of morbilliviruses during serial passages in vitro: Gradual attenuation of virus virulence. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 47, p. 7–18, 1 ago. 2016.

LUNDBERG, L. et al. Nuclear import and export inhibitors alter capsid protein distribution in mammalian cells and reduce Venezuelan Equine Encephalitis Virus replication. **Antiviral Research**, v. 100, n. 3, p. 662–672, 2013.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MANRUBIA, S. C.; DOMINGO, E.; LÁZARO, E. Pathways to extinction: Beyond the error threshold. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1548, p. 1943–1952, 27 jun. 2010.

MASSAD, E. et al. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 11, p. 2303–2312, 1 ago. 2017.

MASTRANGELO, E. et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. April, p. 1884–1894, 2012.

MCARTHUR, M. A. Zika Virus: Recent Advances towards the Development of Vaccines and Therapeutics. **Viruses**, v. 9, n. 143, p. 1–18, 2017.

METSKY, H. C. et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 411–415, 15 jun. 2017.

MILANI, M. et al. Flaviviral methyltransferase/RNA interaction: Structural basis for enzyme inhibition. **Antiviral Research**, v. 83, n. 1, p. 28–34, 2009.

MILLIES, B. et al. Proline-based allosteric inhibitors of Zika and Dengue virus NS2B/NS3 proteases. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. acs.jmedchem.9b01697, 26 nov. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Orientações integradas de vigilância e atenção à saúde no âmbito da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional**. Brasília, : Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/publicacoes/orientacoes\\_emergencia\\_gestacao\\_infancia\\_zika.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/publicacoes/orientacoes_emergencia_gestacao_infancia_zika.pdf)>. Acesso em: 5 nov. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52**. 2020.

MOLINARI, G. et al. In vitro genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, n. 1–3, p. 1074–1082, 2009.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

NEUFELDT, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018.

NG, I. H. W. W. et al. Zika Virus NS5 Forms Supramolecular Nuclear Bodies That Sequester Importin- $\alpha$  and Modulate the Host Immune and Pro-Inflammatory Response in Neuronal Cells. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 932–948, 2019.

NISHIURA, H. et al. Transmission potential of Zika virus infection in the South Pacific. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 95–97, 1 abr. 2016.

NOVELLA, I. S. et al. Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. **Journal of virology**, v. 69, n. 5, p. 2869–2872, 1995a.

NOVELLA, I. S. et al. Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 13, p. 5841–5844, 20 jun. 1995b.

NOVELLA, I. S. et al. Exponential Fitness Gains of RNA Virus Populations Are Limited by Bottleneck Effects. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1668, 1999.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2018). **Zika Cumulative Cases**. Disponível em: <[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content%26view%3Darticle%26id%3D12390:zika-cumulative-cases%26Itemid%3D42090%26lang%3Den](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content%26view%3Darticle%26id%3D12390:zika-cumulative-cases%26Itemid%3D42090%26lang%3Den)>. Acesso em: 4 nov. 2019.

PADMANABHAN, P.; DIXIT, N. M. Models of Viral Population Dynamics. In: **Quasispecies: From Theory to Experimental Systems. Current Topics in Microbiology and Immunology**. [s.l: s.n.]. v. 392.

PERALES, C. et al. The impact of quasispecies dynamics on the use of therapeutics. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 12, p. 595–603, 2012.

PERALES, C. et al. The increasing impact of lethal mutagenesis of viruses. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 1645–1657, 2019.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research**, v. 80, n. 1, p. 11–22, out. 2008.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.

PETTERSSON, J. H. O. et al. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018.

PRYOR, M. J. et al. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin  $\alpha/\beta$ -recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. **Traffic**, v. 8, n. 7, p. 795–807, 2007.

PUBCHEM. **Ivermectin | C48H74O14**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6321424#section=Top>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

RATHER, I. A. et al. ZIKA virus: An emerging worldwide threat. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–7, 2017.

RAWLINSON, S. M. et al. CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 23, p. 15589–15597, 2009.

ROHRER, S. P.; ARENA, J. P. Ivermectin Interactions with Invertebrate Ion Channels. p. 264–283, 1995.

ROY, A. et al. Solution conformations of Zika NS2B-NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180632, 10 jul. 2017.

RUÍZ-JARABO, C. M. et al. Duration and fitness dependence of quasispecies memory. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 3, p. 285–296, 2002.

RUSSELL, P. K. The Zika Pandemic - A Perfect Storm? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004589, 18 mar. 2016.

SANZ-RAMOS, M. et al. Hidden Virulence Determinants in a Viral Quasispecies In Vivo. **Journal of Virology**, v. 82, n. 21, p. 10465–10476, 1 nov. 2008.

SAXENA, S. K. et al. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **VirusDisease**, v. 27, n. 2, p. 111–115, 1 jun. 2016.

SCHUSTER, P. Quasispecies on Fitness Landscapes. In: **Quasispecies: From Theory to Experimental Systems. Current Topics in Microbiology and Immunology**. [s.l: s.n.]. v. 392.

SERMAN, T. M.; GACK, M. U. Evasion of Innate and Intrinsic Antiviral Pathways by the Zika Virus. **Viruses**, v. 11, n. 10, 2019.

SHAILY, S.; UPADHYA, A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. **Reviews in Medical Virology**, n. March, p. e2050, 2019.

SHARMA, V. et al. Zika virus: An emerging challenge to public health worldwide. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 4, p. 1–12, 2019.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 1 jun. 2017.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 339–348, jul. 1964.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. S10, p. S935–S944, 2017.

SLON CAMPOS, J. L.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. R. The immune response against flaviviruses. **Nature Immunology**, v. 19, n. 11, p. 1189–1198, 2018.

SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **Journal of immunology**, v. 69, n. 2, p. 223–34, ago. 1952.

SOUZA, B. S. F. et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, v. 6, 23 dez. 2016.

STRANGE, D. P. et al. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2019.

STROTTMANN, D. M. et al. Genetic and biological characterization of zika virus isolates from different Brazilian regions. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 7, 1 jul. 2019.

SUDEEP, A. B.; PRATIK B. VYAS, D. P.; SHIL., P. Differential susceptibility e replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C636 cells e *Aedes aegypti* mosquitoes to three strains of chikungunya virus. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. June, p. 771–777, 2019.

TAN et al. The Potential Role of the ZIKV NS5 Nuclear Spherical-Shell Structures in Cell Type-Specific Host Immune Modulation during ZIKV Infection. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1519, 26 nov. 2019.

TAY, M. Y. F. et al. Nuclear localization of dengue virus ( DENV ) 1 – 4 non-structural protein 5 ; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 301–306, 2013.

TAY, M. Y. F.; VASUDEVAN., S. G. The Transactions of NS3 and NS5 in Flaviviral RNA Replication. **Springer Nature Singapore**, v. 1062, p. 147–163, 2018.

TEJERO, H.; MONTERO, F.; NUÑO, J. C. Theories of Lethal Mutagenesis: From Error Catastrophe to Lethal Defection. In: **Quasispecies: From Theory to Experimental Systems. Current Topics in Microbiology and Immunology**. [s.l: s.n.]. v. 392.

TURPIN, J. et al. The ZIKA Virus Controls Cell Death through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. n. August, p. 1–15, 2019.

U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Efficacy and Safety of Ivermectin Against Dengue Infection - ClinicalTrials.gov**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02045069>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

VENTURI, G. et al. An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 8, p. 30148, 25 fev. 2016.

VIGNUZZI, M. et al. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 344–348, 19 jan. 2006.

WAGSTAFF, K. M. et al. An AlphaScreen®-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 16, n. 2, p. 192–200, 2011.

WAGSTAFF, K. M. et al. Ivermectin is a specific inhibitor of importin  $\alpha$  /  $\beta$  -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. **Biochemical Journal**, v. 856, p. 851–856, 2012.

WAGSTAFF, K. M.; JANS, D. A. Intramolecular masking of nuclear localization signals: Analysis of importin binding using a novel AlphaScreen-based method. **Analytical Biochemistry**, v. 348, n. 1, p. 49–56, 2006.

WANG, B. et al. The structure of Zika virus NS5 reveals a conserved domain conformation. **Nature Communications**, v. 8, 27 mar. 2017a.

- WANG, C. et al. Nuclear import inhibitor N-(4-hydroxyphenyl) retinamide targets Zika virus (ZIKV) nonstructural protein 5 to inhibit ZIKV infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 4, p. 1555–1559, 2017b.
- WEAVER, S. C. et al. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.
- XU, T.-L. et al. Antivirus effectiveness of ivermectin on dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–14, 2018.
- YAN, D. et al. A Single Mutation at Position 156 in the Envelope Protein of Tembusu Virus Is Responsible for Virus Tissue Tropism and Transmissibility in Ducks. **Journal of Virology**, v. 92, n. 17, 13 jun. 2018.
- YOKOYAMA, S.; STARMER, W. T. Possible Roles of New Mutations Shared by Asian and American Zika Viruses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. msw270, 12 jan. 2017.
- YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 204–219, 2017.
- YUSTE, E. et al. Drastic Fitness Loss in Human Immunodeficiency Virus Type 1 upon Serial Bottleneck Events. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 2745–51, dez. 1997.
- ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.
- ZHANG, C. et al. Structure of the NS5 methyltransferase from Zika virus and implications in inhibitor design. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p. 624–630, 28 out. 2017.
- ZHANG, P. et al. Ivermectin induces cell cycle arrest and apoptosis of HeLa cells via mitochondrial pathway. **Cell Proliferation**, v. 52, n. 2, p. e12543, 1 mar. 2019.
- ZHAO, B. et al. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. **Nature Communications**, v. 8, 27 mar. 2017.
- ZHU, Z. et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerging Microbes and Infections**, v. 5, n. 3, p. e22, 16 mar. 2016.

## APÊNDICE A – Resultados da viabilidade celular

**Tabela 1. Resultados da viabilidade celular.**

Tempo	Não tratado	Veículo	Ivermectina ( $\mu\text{M}$ )					
			5	10	12,5	25	50	100
<b>MTT</b>								
<b>4h</b>	100 $\pm$ 1,13	78,02 $\pm$ 17,96	106,2 $\pm$ 2,77	90,57 $\pm$ 2,61	89,6 $\pm$ 8,5	24,02 $\pm$ 18,45	1,99 $\pm$ 1,02	-1,43 $\pm$ 1,13
<b>36h</b>	100 $\pm$ 1,07	91,81 $\pm$ 1,55	97,62 $\pm$ 0,68	88,3 $\pm$ 0,7	55,43 $\pm$ 8,41	4,67 $\pm$ 0,75	1,37 $\pm$ 0,8	1,29 $\pm$ 0,29
<b>36h + ZIKV</b>	100 $\pm$ 1,58	96,25 $\pm$ 4,05	97,15 $\pm$ 2,54	79,88 $\pm$ 7,67	16,42 $\pm$ 2,41	0,62 $\pm$ 0,25	1,13 $\pm$ 0,67	0,69 $\pm$ 0,48
<b>Vermelho Neutro</b>								
<b>4h</b>	100 $\pm$ 3,79	87,18 $\pm$ 1,81	100,65 $\pm$ 0,41	85,48 $\pm$ 8,47	77,61 $\pm$ 7,77	10,22 $\pm$ 3,74	-2,92 $\pm$ 0,73	-0,93 $\pm$ 0,23
<b>36h</b>	100 $\pm$ 0,95	119,49 $\pm$ 0,86	105,2 $\pm$ 2,11	97,65 $\pm$ 0,76	81,82 $\pm$ 6,37	17,83 $\pm$ 1,13	7,39 $\pm$ 2,74	9,45 $\pm$ 1,22
<b>36h + ZIKV</b>	100 $\pm$ 0,5	113,4 $\pm$ 2,9	66,34 $\pm$ 2,74	48,94 $\pm$ 1,02	17,97 $\pm$ 1,22	-0,94 $\pm$ 1,89	-0,53 $\pm$ 0,64	-4,30 $\pm$ 0,42

Os dados foram normalizados conforme a fórmula da viabilidade celular, descrita no item 3.6 e são expressos pela Média  $\pm$  SEM das porcentagens das duplicatas técnicas.

**APÊNDICE B – Resultados de viabilidade celular após 24h de tratamento  
com IVM**

**Tabela 2. Valores da viabilidade celular das células A549 após 24h de tratamento com Ivermectina pela técnica de MTT.**

Não tratado	Veículo	Ivermectina ( $\mu\text{M}$ )					
		5	10	12,5	25	50	100
<b>100 <math>\pm</math> 3,22</b>	99,08 $\pm$ 4,25	104,28 $\pm$ 0,77	85,33 $\pm$ 0,15	83,21 $\pm$ 5,69	3,64 $\pm$ 0,06	0,2 $\pm$ 0,18	0,10 $\pm$ 0,61

Os dados foram normalizados conforme a fórmula da viabilidade celular, descrita no item 3.6 e são expressos pela Média  $\pm$  SEM das porcentagens das duplicatas técnicas.

**APÊNDICE C – Valores de MOI utilizadas em cada passagem celular do processo de indução de mutação de ZIKV**

**Tabela 3. Valores de MOI utilizados durante o processo de indução de mutação de ZIKV.**

	Não tratado			Veículo			Ivermectina		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>p1a</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>p1b</b>	0,08	0,07	0,08	0,08	0,06	0,06	0,05	0,04	0,04
<b>p2a</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>p2b</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>p3a</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>p3b</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,07	0,03
<b>p4a</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>p4b</b>	0,02	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04
<b>p5a</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>p5b</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,01	0,001
<b>p6a</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,21	0,21	0,3
<b>p6b</b>	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
<b>p7a</b>	0,07	0,07	0,06	0,06	0,04	0,05	0,19	0,12	0,15