

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**“PROSPECÇÃO DE POTENCIAIS ANTIVIRAIS PARA O
TRATAMENTO DE FLAVIVÍRUS, COM ÊNFASE EM ZIKA VÍRUS”**

MARINA AFONSO MEDEIROS

Belo Horizonte

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**“PROSPECÇÃO DE POTENCIAIS ANTIVIRAIS PARA O
TRATAMENTO DE FLAVIVÍRUS, COM ÊNFASE EM ZIKA VÍRUS”**

MARINA AFONSO MEDEIROS

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso
de Pós-graduação em Microbiologia da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito à obtenção do título de Especialista

Aluna: Marina Afonso Medeiros

Orientador: Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte

2017

Dedico este trabalho à minha família,
que esteve sempre presente e que
me apoiou em toda esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Cláudio Bonjardim, pela orientação, paciência e pelo exemplo acadêmico.

Ao ICB, por me proporcionar laboratórios de alto nível e funcionários bem qualificados.

À pós-graduação em microbiologia, por me tornar especialista.

À Coordenação do Curso de Especialização em Microbiologia Aplicada 2017-1.

Aos meus professores, por compartilharem seus conhecimentos, me estimularem e me proporcionarem um aprendizado sólido.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelo apoio e convivência.

À minha mãe, pelo carinho e apoio incondicionais.

Ao meu pai, por acreditar em minhas conquistas.

Aos meus irmãos que me deram e dão muitas alegrias.

À Taiti e Aninha, por estarem sempre presentes e me aconselharem.

“Existem mais verdades naquilo que não se pode ver a olho nu”

Marina Afonso Medeiros

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi buscar, na literatura, como tem sido a prospecção de antivirais para o tratamento de *Flavivirus*, com ênfase no “*Zika vírus*”. A importância deste trabalho reside no reconhecimento de potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de doenças causadas por *Flavivirus*, em especial aquelas causadas por ZIKV, devido à alta prevalência de complicações neurológicas relacionadas à este *Flavivirus*. Para a realização deste trabalho, foi pesquisado sites de busca acadêmica do PUBMED, LILACS e SCIELO. Os *Flavivirus* são envelopados e constituídos por genoma de RNA de fita simples, linear e senso-positivo. São transmitidos por um vetor, o *Aedes sp.* O ZIKV possui três proteínas estruturais (proteínas E, C e prM) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Um estudo genético prévio usando sequência de nucleotídeos derivados de genes NS5 indicou 2 linhagens de ZIKV: Africana (Leste e Oeste) e Asiática. O ZIKV foi isolado em 1947 na Uganda. A linhagem asiática disseminou-se pelo oceano pacífico até a América Central, América do Sul e Brasil, via sudeste da Ásia. O diagnóstico do ZIKV é baseado nas manifestações clínicas (exantema, artralgias, febre baixa e conjuntivite), na detecção de ácido nucléico (PCR) e na detecção de anticorpos (MAC ELISA). É um vírus que causa complicações neurológicas, especialmente microcefalia e Síndrome de Guillain Barré. Para o tratamento dos *Flavivirus* e do ZIKV foi estudado medicamentos sintéticos com alvo nas cinases e tirosinases, análogos de nucleosídeos, inibidores da protease NS2B-NS3; e medicamentos reutilizados em clínica médica, alguns sintéticos, além de medicamentos naturais. Novos estudos poderiam ser realizados também sobre Chikungunya, por apresentar o mesmo vetor e co-circular com o vírus da DENV e do ZIKV.

Palavras-chave: Prospecção de Antivirais. Flavivírus. “*Zika vírus*”. Tratamento.

ABSTRACT

The purpose of this work was to seek, in the literature, how it has been the prospecting of antiviral for the treatment of *Flavivirus*, with emphasis on “*Zika virus*”. The importance of this work lies in the recognition of potential therapeutic targets for the treatment of diseases by *Flavivirus*, in particular by ZIKV, due to the high prevalence of neurological complications related to this *Flavivirus*. For the accomplishment of this work, the academic search sites of PUBMED, LILACS and SCIELO were searched. The *Flavivirus* has an envelop and consists of simple, linear and sense-positive RNA genome. They are transmitted by a vector, the *Aedes sp.* The ZIKV possesses three structural proteins (proteins E, C and prM) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). A previous genetic study using sequence of nucleotides derived from NS5 genes indicated 2 lineages of ZIKV: African (East and West) and Asian. The ZIKV was isolated in 1947 in Uganda. The Asian lineage spread from the Pacific Ocean to Central America, South America and Brazil, via Southeast Asia. The diagnosis of ZIKV is based on clinical manifestations (rash, arthralgias, low fever and conjunctivitis), and detection of nucleic acid (PCR) and antibodies (MAC ELISA). This is a virus that causes neurological complications, especially Microcephaly and Guillain Barré syndrome. For the treatment of *Flavivirus* and ZIKV was studied synthetic medicines aimed at kinases and tirosinases, analogues of nucleoside, inhibitors of protease NS2B-NS3; and repurposed medicines in medical clinic, some synthetics, besides natural medicines. New studies could also be conducted on Chikungunya, because it presents the same vector and co-circulate with the viruses of DENV and ZIKV.

keyword: Prospection. Antivirals. Flaviviruses. “*Zika Virus*”. Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos *Flavivirus*.

Figura 2- Representação esquemática da organização do genoma dos *Flavivirus*.

Figura 3 – Circulação do “*Zika vírus*” no mundo.

Figura 4- Estrutura química dos flavonoides.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Genomas mais comuns do ZIKV, de acordo com LADER, *et al*, 2016.

Tabela 2- A tabela mostra 4 mecanismos de ação antiviral dos flavonóides.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Diagnóstico diferencial de ZIKV, DENV e CHIKV. Observar os principais sinais e sintomas e a intensidade dos mesmos nas infecções pelo ZIKV, DENV e CHIKV.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-SL: Alça longa no 3'terminal

5'CS: 5' de ciclização

5' CS-PK: 5' ciclização- Pseudoknot

AAK1- proteína cinase 1

AP1-proteína adaptada 1

AP2- proteína adaptada 2

AP3- proteína adaptada 3

AP5-proteína adaptada 5

ATP: adenosina trifosfato

BVDV-1: "*Bovine viral diarrhea virus 1*"

CDC: "*Centers for Disease Control*" (U.S.A)

CHIKV: "*Chikungunya vírus*"

CHP: C-proteína

CIUR- Crescimento intrauterino restrito

DENV- "*Dengue vírus*"

ERK- ácido etileno diamino tetra-acético

FDA- "*Food and Drug Administration*" of U.S.A.

GAK- Ciclina G cinase

GBS- Síndrome de Guillain-Barré

GyrB- DNA girase B

HIS51-histidina 51

HHV-1: "*Human herpesvirus 1*"

HHV-2: "*Human herpesvirus 2*"

HBV: “*hepatitis B vírus*”

HCV: “*Hepatitis C vírus*”

HIV- “*Human immunodeficiency vírus*”

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IFN- Interferon

IRNM: imagem por ressonância nuclear magnética

JEV- Vírus da Encefalite Japonesa

kDa: kilo daltons

LCR: líquido cefalorraquidiano

LYS54-lisina 54

MAC-ELISA: ensaio imunoenzimático ligado à enzima

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

MAPKK: MAPK cinase

MAPKKK: MAPK cinase cinase

MEK-cinase da MAK ERK

MET51- metionina 51

MCPH: microcefalia.

miRNA: microRNA

M.M-mieloma múltiplo

nm- nanômetro

NS2B-NS3-pro: proteases nucleosídeo 2B e nucleosídeo 3.

OMS- Organização Mundial da Saúde

ORF: fase aberta de leitura.(“open Reading frame”)

PAMPS -padrões moleculares associados a patógenos

pH: Potencial Hidrogeniônico

PK: Pseudoknot

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

PK-proteínas cinases

PKT- proteínas tirosinas cinases

PRNT: teste de neutralização da redução da placa.

qRT-PCR: teste quantitativo de transcrição reversa seguido de PCR

RE: retículo endoplasmático.

RNA- Ácido Ribonucleico

rRT-PCR: transcrição em tempo real seguido de PCR.

SER81-serina 81

sfRNA: Ácido ribonucleico de fita simples

SFK- família Src de tirosina cinase

SLA: Alça 5'terminal A

SLB: Alça B

SLEV- "*Saint Louis encephalitis vírus*"

SNC-sistema nervoso central

U.S- Ultrassom

U.T.R- região terminal não codificadora.

VAL155- Valina 155.

WNV- "*West Nile virus*"

YFV- "*Yellow Fever virus*"

ZIKV- "*Zika virus*"

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Quadros	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
1 Justificativa	16
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivo específico	16
3 Introdução	17
3.1 A família <i>Flaviviridae</i>	17
3.2 Ciclo de multiplicação dos <i>Flavivirus</i>	17
3.3 Biologia dos <i>Flavivirus</i>	20
3.4 Agente etiológico e vetores transmissores do ZIKV	26
3.5 Epidemiologia do ZIKV	27
3.6 Patogênese e Manifestações Clínicas do ZIKV	30
3.6.1 Patogênese	30
3.6.2 Sinais e Sintomas	31
3.6.2.1 Síndrome de Guillain- Barré	31
3.6.2.2 Transmissão vertical e microcefalia	32
3.7 Transmissão	33
3.8 Diagnóstico e diagnóstico diferencial	33

3.9 Tratamento das infecções causadas por <i>Flavivirus</i> , com ênfase em ZIKV	37
3.9.1 Introdução	37
3.9.2 Medicamentos antivirais naturais - as Curcuminas, os Flavonóides e as Carrageninas	38
3.9.3 Proteínas cinases e tirosinases	42
3.9.4 Drogas sintéticas ou drogas reutilizadas como segundo uso medicamentoso para o tratamento de <i>Flavivirus</i> com ênfase no ZIKV	43
3.9.4.1 Drogas que inibem a adsorção viral	43
3.9.4.2 Drogas inibidoras da NS2B-NS3-protease	44
3.9.4.3 Análogos de nucleosídeos	45
3.9.4.4 Cloroquina/Mefloquina	47
3.9.4.5 Outras drogas	48
4 Considerações finais	49
5 Referências Bibliográficas	50

1 JUSTIFICATIVA

Os *Flavivirus* são vírus pertencentes à família *Flaviviridae* sendo transmitidos por insetos vetores. Os *Flavivirus* mais importantes em saúde pública no Brasil são o “*Dengue virus*” (DENV), o “*Zika virus*” (ZIKV), e o “*Yellow Fever virus*” (YFV- vírus da febre amarela).

A transmissão de *Flavivirus* por vetores depende de condições climáticas favoráveis, como clima tropical e subtropical. Depende, também, de condições sócio-econômicas como, por exemplo, acúmulo de água parada em esgotos e lixo urbano, um fator fundamental para a sobrevivência do vetor e, portanto, destes vírus.

O ZIKV é um *Flavivirus* de caráter emergente, pandêmico, cuja infecção aguda pode passar despercebida. Todavia, sua importância apoia-se no fato de que o ZIKV pode levar a complicações neurológicas como microcefalia em fetos e Síndrome de Guillain-Barré.

A importância deste trabalho é o estudo de potenciais antivirais que possam inibir a multiplicação de *Flavivirus*, para evitar quadros como a síndrome do choque hemorrágico do DENV, a alta mortalidade daquele e da YFV e as complicações neurológicas do ZIKV. Já que não existem vacinas com eficácia contra ZIKV, este estudo é de particular importância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Buscar, na literatura, como tem sido a prospecção de antivirais para o tratamento de *Flavivirus*, com ênfase no ZIKV.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Pesquisar fármacos naturais ou sintéticos originais, ou ambos, já existentes, como segundo uso (reposição) medicamentoso como potenciais antivirais para o tratamento de *Flavivirus*, com ênfase em ZIKV.

3 INTRODUÇÃO

Esta introdução contempla os principais aspectos relacionados aos vírus da família *Flaviviridae*, com ênfase no “*Zika virus*”, baseados em revisão concisa da literatura.

3.1 A família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae*, possui mais de 80 espécies de vírus e é dividida em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. Os protótipos de cada gênero, respectivamente, são: *Yellow fever virus* (YFV), *Hepatitis C virus* (HCV), *Pegivirus A* e *Bovine viral diarrhea virus1* (BVDV-1). O gênero *Flavivirus* é o maior dentro dessa família, constituído por 53 espécies, e a maior parte deles é transmitido para hospedeiros vertebrados por vetores artrópodes infectados, mosquitos ou carrapatos, nos quais se replicam de forma ativa. Alguns *Flavivirus* são agentes zoonóticos transmitidos entre roedores ou morcegos sem vetores conhecidos (ARIA, 2017).

Os *Flavivirus* são vírus esféricos, envelopados, da família *Flaviviridae*, que possuem ~11,0 (kilobases) de comprimento e 40-50 nanômetros de diâmetro. São vírus constituídos por genoma de RNA de fita simples (não segmentada), linear e senso-positivo. A maioria dos *Flavivirus* são transmitidos por vetores artrópodes, sendo considerados, portanto, arbovirose. Os *Flavivirus* incluem o do “*Zika virus*” (ZIKV), o “*Dengue vírus*” (DENV), o “*Yellow Fever vírus*” (YFV), o “*West Nile vírus*” (WNV), o “*Japanese encephalitis vírus*” (JEV) e o “*Saint-Louis encephalitis vírus*” (SLEV) (HEUKELBACH *et al*, 2016). Nosso objeto de estudo será o ZIKV.

3.2 Ciclo de multiplicação dos *Flavivirus*

A primeira etapa do ciclo de replicação dos *Flavivirus* se dá pela adesão do vírus na superfície da membrana celular. O vírion se liga à célula usando fatores de adesão, como a lecitina-DC e vários membros da família de receptores de fosfatidilserina. O vírus então penetra na célula através da endocitose mediada pela clatrina. Uma vez no interior da célula, o vírus é transportado até os endossomos, onde o baixo pH causa conformações

específicas na glicoproteína E, provocando a fusão entre o envelope viral e o endossomo (YUN; LEE, 2017).

Com a fusão de membranas, ocorre o desnudamento, e o genoma viral do RNA é liberado no citosol, onde funciona como um RNA mensageiro e direciona a síntese da poliproteína em associação ao retículo endoplasmático. A poliproteína é clivada por proteases virais e celulares para gerar três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. Após a tradução, o genoma RNA senso positivo viral serve como molde para a síntese da fita senso negativa complementar do RNA. Sucessivamente, o novo RNA senso negativo serve como molde para a síntese de genoma senso positivo”. (YUN; LEE, 2017) - (Figura 1).

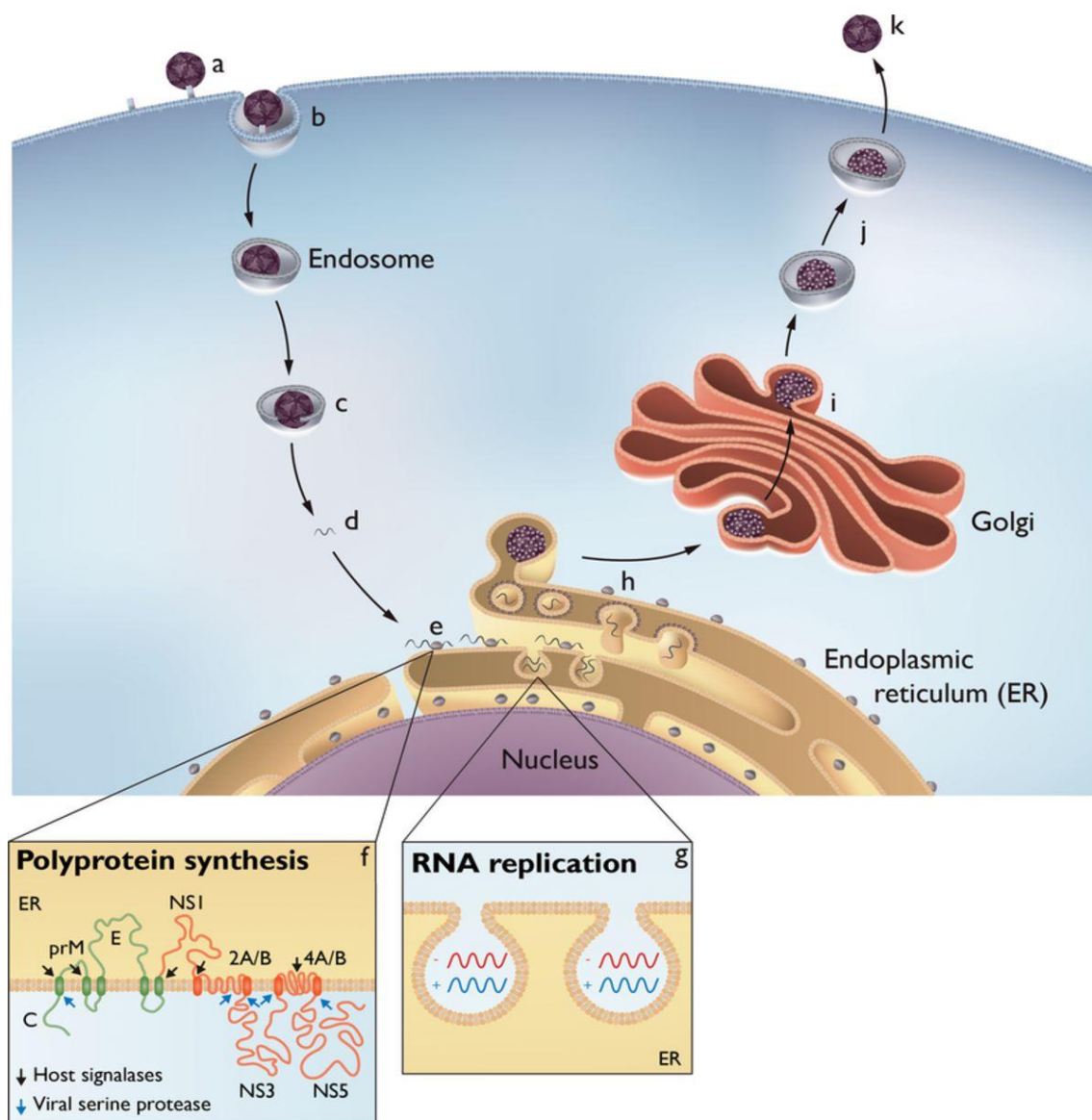


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos *Flavivirus*.

Resumidamente, o vírion se liga a receptores específicos presentes na superfície celular (a) e, posteriormente, é endocitado em vesículas recobertas por clatrininas (b). O baixo pH no endossomo induz a fusão do envelope do vírus com membranas do endossomo (c), com consequente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (d). O RNA migra ao RE (e) onde ocorre a tradução e síntese da poliproteína (f). Em seguida, ocorre a replicação do RNA (g), montagem do vírion imaturo (h) e passagem pelo trans-Golgi (i). A mudança de pH provoca a clivagem do prM pelas furinas (j) e a liberação do vírion maduro ocorre por exocitose (MLERA *et al*, 2014).

Posteriormente, ocorre a montagem do vírus. Todas as sete proteínas não estruturais estão diretamente ou indiretamente envolvidas na replicação viral.

Várias atividades enzimáticas têm sido associadas a duas proteínas não estruturais: NS3 e NS5. A NS3 consiste em um domínio serina N-terminal protease e um domínio C-terminal helicase; e NS5 é composta de um domínio N-terminal com atividade metiltransferase e um domínio C-terminal com atividade RNA polimerase-RNA dependente (YUN; LEE, 2017). Para que a montagem do vírus ocorra, no complexo de golgi a prM é clivada, por ação da enzima furina, em proteína M e peptídeo pr. Esse processo proteolítico dá origem a rearranjos estruturais das proteínas M e E. Desta forma, o vírion completo ou parcialmente maduro transportado para a superfície celular para liberação por exocitose. (YUN; LEE, 2017) - (Figura 1).

Vários fatores regulam a síntese e a replicação de *Flavivirus*. A proteína NS5 de YFV e DENV-2 são importadas para o núcleo (SELISKO *et al*, 2014). O sequestro de NS5 para o núcleo pode representar uma via para regular a síntese de RNA viral, que ocorre no citoplasma. Mesmo assim, diferenças substanciais têm sido encontradas na percentagem de NS5 que é direcionada para o núcleo entre diferentes *Flavivirus* (SELISKO *et al*, 2014).

Todas as proteínas não-estruturais se co-localizam com ds-RNA para a membrana embebida do RE ativa no complexo de replicação. Entre elas, apenas NS1, NS2A, NS4A e NS4B, foram demonstradas regular a síntese do RNA, apesar de que o mecanismo molecular não ter sido bem definido (SELISKO *et al*, 2014). Diferentemente de NS5, o segundo principal constituinte no complexo de replicação do *Flavivirus* é NS3. NS3 protege a protease viral NS2B ativada e seu domínio C-terminal (NS3- HELICASE). A replicação de RNA pode também ser modulada por proteínas do hospedeiro,

que interagem com os componentes virais do complexo de replicação (SELISKO, *et al*, 2014).

3.3 Biologia dos *Flavivirus*

O genoma do *Flavivirus* contém uma estrutura “cap” do tipo I na extremidade 5’ não codificadora contendo aproximadamente 96 nucleotídeos, uma única janela de abertura de leitura (ORF-“Open Reading Frame”) contendo aproximadamente 10.300 nucleotídeos, e uma região 3’ terminal não codificadora contendo aproximadamente 631 nucleotídeos, e não apresentando uma cauda poliA. A única janela de leitura aberta codifica uma poliproteína que é clivada em 3 proteínas estruturais que constituem o capsídeo C, a pré-membrana/membrana (prM) e o envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B, NS5). (AGUIAR, 2017) - (Figura 2).

A presença de 5’ cap metilado no genoma do RNA dos *Flavivirus* exerce um importante papel na tradução e replicação viral e na evasão da restrição do hospedeiro na replicação viral (YUN; LEE, 2017).

A região 5’ não codificadora é requerida para modular a tradução e as outras fases da replicação do RNA viral entre os RNAs da região 5’ não codificadora e da região 3’ não codificadora. (YUN; LEE, 2017). A região 5’ não codificadora também está envolvida em reagir à resposta celular do hospedeiro à infecção do vírus por servir como um substrato para a exorribonuclease celular do hospedeiro, para dar origem ao subgenoma de *Flavivirus* de RNA curto não codificante, assim contribuindo para replicação viral e patogênese (YUN; LEE, 2017).

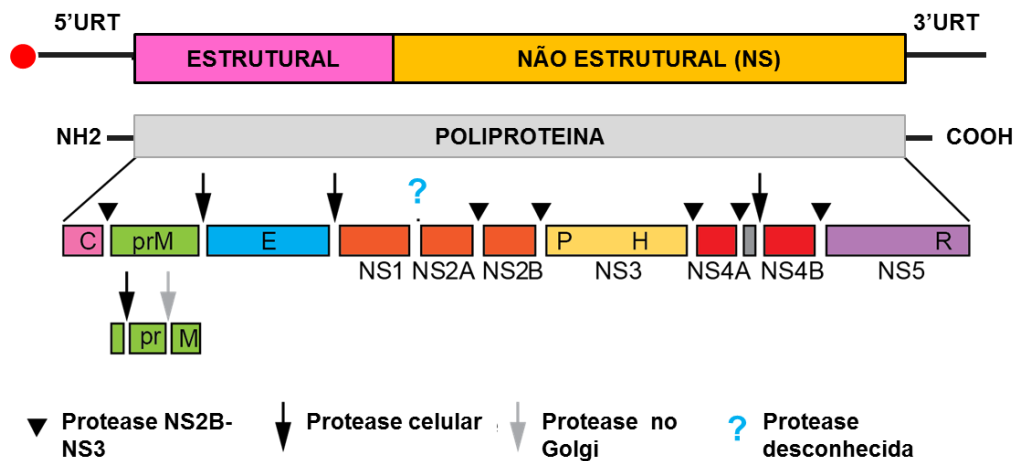


Figura 02- Representação esquemática da organização do genoma dos *Flavivirus*.

Na parte superior, observa-se a organização do genoma dos *Flavivirus* (sem escala) com as regiões codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais, as quais estão flanqueadas pelas regiões 5'UTR e 3'UTR não codificantes. Na parte inferior, a organização da poliproteína com os sítios de processamento de proteases celulares (↓) ou virais (▼) ou desconhecidas (?). Os símbolos P, H e R indicam a localização da protease/helicase da NS3 e a NS5 RNA polimerase-RNA dependente (RdRp), respectivamente (ARIAS, 2017).

A ORF (“Open Reading Frame”)/fase de leitura aberta codifica uma poliproteína precursora, que após sofrer processamento co/e pós-traducional por proteases virais e celulares origina 3 proteínas estruturais que compõem a partícula viral (YUN; LEE, 2017).

A proteína do capsídeo viral (C) possui aproximadamente 120 aminoácidos e está presente no nucleocapsídeo. Associa-se à membrana celular e à uma região C-terminal que atua como um peptídeo-sinal para a translocação de prM ao retículo endoplasmático, sendo que este domínio é clivado posteriormente da proteína C madura por uma serina protease viral. A proteína prM é uma glicoproteína precursora da proteína estrutural M e sua principal função é prevenir o rearranjo da proteína E para a sua forma fusogênica, durante o seu transporte pela via secretória, com a clivagem em fragmentos pr e M. Essa clivagem está relacionada à maturação viral e evita que os vírions imaturos se fusionem à membrana celular hospedeira. A proteína E é a maior proteína de superfície dos vírions e medeia a interação com os receptores celulares e a fusão com a célula alvo (AGUIAR, 2017).

As proteínas não estruturais são importantes para o processamento da poliproteína, a replicação do RNA e o empacotamento viral. A glicoproteína NS1 se encontra retida dentro da célula, mas também pode ser encontrada na superfície celular. Esta proteína desempenha um papel no processo de replicação do RNA viral. Além disso, estimula a resposta a anticorpos contra as proteínas de superfície para conduzir a lise de células infectadas via complemento (AGUIAR, 2017).

NS2A é uma proteína hidrofóbica associada à membrana, que está envolvida no processo de replicação e empacotamento viral. NS2B também é uma pequena proteína associada à membrana que forma um complexo estável com NS3 e age como co-fator para a atividade catalítica desta serina-protease viral (AGUIAR, 2017).

NS3 é uma proteína multifuncional requerida para o processamento da poliproteína e para a replicação do RNA viral. A clivagem co- e pós-traducional da poliproteína é realizada pela NS3 na porção citoplasmática do retículo endoplasmático e por proteases citoplasmáticas no lúmen do retículo endoplasmático para dar origem à proteína madura. Um terço da porção N-terminal da proteína contém a protease viral (NS3pro), que necessita de uma porção de NS2B para a sua atividade catalítica, enquanto o restante da proteína (NS3hel) apresenta a função de helicase, NTPase (nucleosídeo 5' trifosfatase) e RTPase (RNA 5' trifosfatase), que são essenciais para a replicação viral e para a reação de *capping* da extremidade 5' do RNA viral (AGUIAR, 2017).

NS4A é uma pequena proteína hidrofóbica e está localizada nos sítios de replicação de RNA e interage com NS1 no processo de replicação do RNA. O NS4B localiza-se com NS3 e com RNA viral fita dupla em possíveis sítios de replicação de RNA derivados de estruturas da membrana do retículo endoplasmático, se liga à porção terminal ou NS3, permitindo a sua dissociação do RNA de fita simples, a sua ligação à um novo duplex, aumentando, assim, a atividade de helicase de NS3 (AGUIAR, 2017).

NS5 é a maior e mais conservada proteína entre os *Flavivirus*, possuindo atividade metiltransferase e RNA dependente de RNA polimerase (Rd-Rp),

sendo importante para a replicação e para a formação do “cap” no 5’ do RNA viral (AGUIAR, 2017).

O genoma do RNA do ZIKV é constituído por uma ORF contendo 10.794 nucleotídeos com uma curta região 5’ não codificante de 106 nucleotídeos e uma região 3’ não codificante de 428 nucleotídeos. Os quatro possíveis nucleotídeos não são usados com frequências idênticas, variando de 2305 U (21,3%) e 3139 G (29,1%) (HEMERT *et al*, 2016). O genoma contém (G+A 56,8%) de purinas e (C+ U 43,2%) de pirimidinas. A ORF do ZIKV codifica uma poliproteína que é clivada em 3 proteínas estruturais que constituem o capsídeo C, a pré-membrana/membrana (prM) e o envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B, NS5) (HEMERT *et al*, 2016).

Um estudo genético prévio usando sequência de nucleotídeos derivados de genes NS5 indicou 2 linhagens de ZIKV: Africana (Leste e Oeste) e Asiática (HADDOW, *et al*, 2012). Dos cinco genomas virais do ZIKV, 4 deles foram isolados na África (Senegal e Uganda), sendo que o genoma africano mais bem conhecido é o MR766 (MOTA, *et al*, 2016). Um genoma (FSS13025) foi isolado em Camboja e pertence à linhagem Asiática. (LADNER *et al*, 2016). Um genoma brasileiro da linhagem asiática também foi isolado (ZKV2015) (tabela 1).

Africano	MR766
Asiático	PRVABC59
Camboja (linhagem Asiática)	FSS13025
Brasil (linhagem Asiática)	ZKV2015

Genomas mais comuns do ZIKV, de acordo com LADER, *et al*, 2016.

O sequenciamento dos genes do NS3 do ZIKV identificou 3 linhagens distintas: leste Africana, oeste Africana (genomas MR766) e Asiática (PRVABC59) (MEGAN;RYAN, 2016; HOU, *et al*, 2017). O isolamento da linhagem circulante no hemisfério oeste indica que o vírus original introduzido na América do Sul foi um vírus da linhagem Asiática (MEGAN; RYAN, 2016).

Linhagens africanas são destituídas de glicosilação de ASN154 na proteína E (a superfície do vírion é formada pelas proteínas E e M. A proteína E é glicosilada, pesando 53KDa. A proteína E é o principal determinante antigênico). ASN154 é associada à neuroinvasão, sugerindo que o vírus com este determinante possui tropismo pelo tecido nervoso. (MEGAN; RYAN, 2016).

A estrutura recente da proteína E do ZIKV observada na resolução de 3,8 Angstroms, tem revelado uma grande diferença no aminoácido ASN154, quando comparado com outros *Flavivirus*. Dentro desta glicoproteína, ZIKV tem um sítio de glicosilação no ASN154, enquanto DENV tem dois sítios de glicosilação em ASN67 e ASN153, que influenciam a montagem e liberação virais e a infectividade viral, respectivamente. O “*West Nile vírus*” tem um sítio de glicosilação em ASN154, que tem sido associado ao neurotropismo (DA SILVA; GAO, 2016). É possível que alterações nos sítios de glicosilação podem estar associados com diferenças de tropismo, infectividade, e patogenicidade entre várias linhagens de ZIKV. Alguns sítios de glicosilação estão ausentes em outras linhagens africanas (DA SILVA; GAO, 2016). Uma análise comparativa das linhagens africana e asiática mostrou 59 variações de aminoácidos entre elas, e também que 10% da variação estão localizados na proteína prM”. (DA SILVA; GAO, 2016).

Os vírions do ZIKV contêm 180 cópias de proteína E, quantidade desconhecida de outras proteínas e uma molécula única de RNA viral (MCLEAN, *et al*, 2017). A proteína E é arranjada como 90 homodímeros antiparalelos em padrão de “espinha-de-peixe” com simetria icosaédrica e cada homodímero tem 3 partes topográficas: (1) um ectodomínio alongado e atividade difusão de membrana; (2) uma haste que contém 2 alfa-hélices, situando quase plano na membrana viral sob o ectodomínio; e (3) região transmembrana, que forma bobina de espiral enrolada antiparalela (YUN; LEE, 2017).

Desta forma, o domínio E forma 3 domínios estruturais: (1) domínio I, que se localiza no centro do ectodomínio; (2) domínio II, que contém a fusão hidrofóbica no seu término (YUN; LEE, 2017) e (3) domínio III, o qual está implicado em se ligar aos receptores e neutralizar anticorpos (YUN; LEE, 2017)

Para Yun e Lee (2017):

Cinco elementos do RNA 5'-terminal constituem: (1) a haste-alça 5'-terminal A (SLA), que liga a proteína viral NS5 e promove a síntese de RNA; (2) 3 sequências curtas conservadas entre a sequência 5' a montante da região AUG (5' UAR), a sequência a jusante da região AUG (5' AUR) e a sequência 5' de ciclização (5' CS), que está envolvida na ciclização do genoma viral através do pareamento de bases com sequências complementares localizadas na 3' NCR; (3) a haste-alça B (SLB), que está localizada à jusante de SLA, com 5'UAR embutido no interior dela; (4) Um grampo na região codificadora da C-proteína (CHP), que é crítica para o reconhecimento e tradução do códon de iniciação da síntese proteica e para a síntese de RNA; e (5) 3'-haste-alça "pseudoknot" terminando a sequência a jusante a do 5' CS "pseudoknot" (5'CS-PK), que aumenta a replicação do RNA viral através da regulação da ciclização do genoma (YUN; LEE, 2017).

Continuando, os mesmos autores afirmam:

Cinco elementos do RNA 3' -terminal constituem: (i) a haste-alça longa no 3'-terminal (3'- SL), que é necessário para a replicação do RNA viral e é caracterizado por interagir com várias proteínas celulares; (ii) uma série de sequências curtas conservadas (3'-UAR, 3' DAR, e 3'CS) que estão envolvidas em um longo alcance de interação RNA-RNA intragenômico com suas sequências complementares para a circulação de seu genoma, um pré-requisito para a replicação do RNA; (iii) Um pequeno grampo, que está localizado imediatamente à montante de 3' SL e parcialmente sobrepondo as sequências de 3'UAR e 3'DAR, sugerindo então um papel entre as formas linear e circular do genoma de RNA viral durante a replicação (YUN; LEE); (iv) uma estrutura em forma de haltere, com sua alça distal envolvida na formação de "pseudoknot", que tem um importante papel na replicação do RNA viral; (v) um par de alças duplicadas, cada uma envolvidas em múltiplas interações de "pseudoknots" e promovida pela produção de RNA de fita simples (sfRNA) e adaptação do hospedeiro (YUN;LEE, 2017).

ZIKV é conhecido por produzir sfRNA (RNA de fita simples), como resultado de degradação incompleta do genoma de RNA pelas 5'-3'exorribonuclease 1 (XRN1) celular (YUN; LEE, 2017).

Os microRNA ou miRNA são pequenos RNA codificantes que agem como reguladores de genes. miRNA tem efeito na função imune, apoptose e

tumorigênese, sendo específico de primatas. É expresso em baixos níveis em células tronco de embriões humanos e após diferenciação destas células em órgãos de embriões (MCLEAN *et al*, 2017).

Seis miRNA compartilham homologia com sequências genéticas de 12 MCPH (12 loci de genes responsáveis pela microcefalia), que podem ser responsáveis por induzir microcefalia em fetos humanos. São eles: miR-625-5, miR4846, miR1304, miR6771, miR4528, miR3198. MiR 1304 parece ser iniciado pelo gene do envelope viral E (MCLEAN, *et al*,2017).

Doze MCPH loci (MCPH1-MCPH2) foram mapeados no ZIKV contendo os seguintes genes: “Microcephalin”, WDR62, CDK5RAP2, CASC5, ASPM, CENPJ, STIL, CEP135, CEP152, ZNF335, PHC1 e CDK6” (MCLEAN, *et al*, 2017).

3.4 Agente etiológico e vetores transmissores do ZIKV

Dentre os principais vetores do gênero *Aedes*, o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* transmitem o ZIKV. O *Ae. aegypti* invadiu a Ásia no século XIX, onde aumentou em abundância e foi associado ao decréscimo de *Ae. albopictus* no sudeste da Ásia. O *Ae. albopictus*, nativo da Ásia, se disseminou com sucesso e se estabeleceu nas Américas, Europa, e África, e principalmente nas últimas três últimas décadas, incluindo expansão para regiões de clima temperado. No Brasil, o vetor *Ae. aegypti* é mais frequente no habitat urbano, enquanto o *Ae. albopictus* no ambiente não-urbano (suburbano ou rural). *Ae. aegypti* coexiste com *Ae. albopictus* em áreas de transição entre regiões de alta urbanização e área rural. Ambos vetores coexistem também em áreas suburbanas. No Brasil, *Ae. albopictus* foi primeiramente detectado em 1986 e, apesar de que sua disseminação e estabelecimento não tenham sido monitorados continuamente, em 2014, *Ae. albopictus* foi detectado em 25 de 27 estados da federação e em 59% dos municípios brasileiros (CAMARA, *et al*, 2016). Outros gêneros do *Aedes* são *Ae. apicus*, *Ae. argenteus*, *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vitattus*, *Ae. hensilli*.

Por ter um vetor em comum (*Aedes sp.*), o ZIKV, e o DENV, além do Chikungunya (que é um *Alphavirus*) co-circulam no Brasil. A co-infecção não é rara, dificultando o diagnóstico, pelo fato do *Aedes sp*, além de transmitir o

ZIKV, transmite doenças com manifestações clínicas semelhantes, como o “*Dengue virus*” e da “*Chikungunya virus*”.

3.5 Epidemiologia do ZIKV

O primeiro caso de “*Zika virus*”(ZYKV) ocorreu em Uganda, onde se isolou o vírus no ano de 1947, em macaco Rhesus sentinela (Rhesus 766), na floresta de Zika. Em 1952, foram identificados casos em seres humanos em Uganda e na Tanzânia.

A linhagem Asiática se expandiu geograficamente desde o início do ano 2000, causando 3 surtos históricos de ZIKV: (1) O surto de 2007 na ilha de Yap, que provavelmente surgiu no sudeste da Ásia (LACIOTTI *et al*, 2008; DUFFY *et al*, 2009, HADDOW *et al*, 2012); (2) O surto de 2013-2014 na Polinésia Francesa, que presumivelmente resultou de uma introdução de uma cepa similar da Camboja (2010) e a cepa da ilha de Yap (2007) e (3) O surto da América Latina de 2015-2016, que foi provavelmente causado por uma disseminação da linhagem asiática derivada da cepa das ilhas pacíficas (YUN; LEE, 2007). A linhagem Asiática surgiu na África subsaariana e foi disseminada pelo oceano Pacífico até a América Central, e à América do Sul e Brasil, via Sudeste da Ásia. A linhagem Africana, ao invés da linhagem Asiática, não foi relacionada a alterações neurológicas associadas à infecção (MOTA, *et al*. 2016). A linhagem Asiática foi a primeira a se instalar no Brasil (FIGURA 3).

Em outubro de 2014, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, houve um surto de doença exantemática autolimitada de etiologia desconhecida, cujas principais manifestações foram febre ou ausência desta, exantema maculopapular, prurido, artralgias, edema de membros inferiores, durando 4-7 dias. Outros diagnósticos, como Dengue, Chikungunya e rubéola, foram descartados. Em março de 2015 foi realizado PCR com identificação de ZIKV nos estados do Rio Grande do Norte e Bahia. Em algumas semanas, foi identificado o ZIKV no nordeste, norte, sudeste e sul do país (LAZEAR *et al.*, 2014).

Em março de 2015, casos autóctones de ZIKV foram relacionados a doença exantemática. O vírus também foi identificado no fluido cerebrospinal de pacientes com síndromes neurológicas agudas e doenças exantemáticas prévias (HEUKELBACH *et al.*, 2016).

No período compreendido entre 08/11/2015 e 06/05/2017, ocorreram 13.719 casos de alterações no crescimento e desenvolvimento de crianças possivelmente associados à infecção pelo ZIKV. Foram confirmados 2.722 casos e 127 foram classificados como prováveis para relação com infecção congênita durante a gestação. Continuam em investigação 3.245 casos e 5.817 foram descartados (Boletim Epidemiológico-Ministério da Saúde, v. 48. n.17 2017).

Em primeiro de fevereiro de 2016 o Ministério da Saúde declarou emergência de saúde pública de interesse internacional devido a desordens neurológicas associadas a rápida emergência do ZIKV nas Américas (HEUKELBACH *et al.*, 2016).

Condições climáticas e ambientais no Brasil, como clima tropical quente e úmido e condições sanitárias precárias, favorecem a multiplicação do vetor, assim como o fato de ser um país populoso e vulnerável à sua disseminação.

Finalmente, houve um grande declínio dos casos notificados de microcefalia e outros casos de distúrbios neurológicos por mês e por região no Brasil, atribuídos ao ZIKV de 2015 a 2016. Esse declínio poderia ser sazonal, com diminuição da infestação pelo mosquito no outono e no inverno, ou a conscientização das mulheres em relação ao risco de uma gravidez com a presença de uma infecção pelo ZIKV, causando danos neurológicos ao feto, fazendo com que elas postergassem uma gravidez. Todavia, os casos ainda se mantêm altos, em parte devido à chegada do verão, mas espera-se que aqueles se encontrem mais baixos dos que em 2015 e 2016 (POSSAS *et al.*, 2017).

Portanto, em 11 de maio de 2017, o Ministério da Saúde declarou o fim da emergência de saúde pública de importância nacional (ESPIN) em decorrência do Zika e de sua associação à microcefalia e à outras alterações neurológicas.

Todavia, o governo Brasileiro divulga que a assistência às mães e crianças afetadas será mantida (Boletim Epidemiológico vol.17 2017 M.S.).

3.6 Patogênese e Manifestações Clínicas do ZIKV

3.6.1 Patogênese

Após a inoculação do ZIKV no homem, o período de incubação varia de 4-10 dias e os sintomas duram de 3-7 dias. A infecção pelo ZIKV é sintomática em apenas 20-25% dos infectados, que desenvolvem uma doença auto-limitada (SONG *et al*, 2017).

Após a picada do mosquito, queratinócitos e células dendríticas na pele do indivíduo infectado são os primeiros alvos da infecção pelo ZIKV. A viremia se desenvolve 1-5 dias depois, e o vírus é eliminado da circulação dentro de 2 semanas de infecção (LAZEAR *et al*, 2016).

Alguns *Flavivirus*, como o DENV, o ZIKV e o YFV, podem ser encontrados no soro após a viremia da doença aguda, o que é denominado persistência da infecção. A persistência da infecção pelos *Flavivirus* é caracterizada por evasão da resposta antiviral do hospedeiro. Nesse caso, é produzido interferon em horas, mas o complexo de replicação do RNA viral contido em pacotes de vesículas, pode proteger os patógenos do seu reconhecimento pelos receptores de reconhecimento de PAMPS (padrões moleculares associados a patógenos) pelo organismo, sendo postergada a produção de interferon (resposta antiviral). Além disso, alguns *Flavivirus* transmitidos por vetor podem afetar diretamente a produção de interferon por inibição da transcrição do gene que expressa a produção de interferon, suprimindo a sinalização do interferon ou comprometendo as funções dos genes estimulados por interferon. As respostas imunes celular e humoral também são inibidas por *Flavivirus* transmitidos por vetor (MLERA *et al*, 2014).

A proteína E pode ser a responsável por provocar o efeito citopático. Apesar disso a protease NS3 e a NS2B-NS3 precursora da protease, também são conhecidas por induzir a apoptose através da ligação da CASPASE 8. NS2A também tem sido implicada em causar efeito citopático IFN-dependente (MLERA *et al*, 2014).

3.6.2 Sinais e sintomas

Nos pacientes sintomáticos, os sinais e sintomas mais comuns são febre baixa, exantema maculopapular pruriginoso, artrite e artralgia, conjuntivite não purulenta, dor retro-orbitária, cefaleia, mialgia, edema de membros inferiores e vômitos. Com menos frequência pode-se observar hematospermia, hipoacusia, trombocitopenia e petéquias. Os sintomas se resolvem em sete dias, mas a artralgia pode persistir por até um mês (SONG *et al*,2016).

3.6.2.1 Síndrome de Guillain- Barré

A síndrome de Guillain-Barré (GBS) é uma doença neuromuscular (polirradiculoneuropatia), monofásica, desmielinizante, autoimune, em que o sistema imunológico acomete parte do sistema nervoso periférico causando parestesias, fraqueza muscular, paralisia flácida, podendo levar ao óbito (devido a dificuldades respiratórias, porque pode acometer a musculatura que é responsável pela respiração). Os sinais e sintomas progridem em 1-2 semanas. Parestesias geralmente abrem o quadro clínico de GBS. Fraqueza muscular simétrica é acompanhada de depressão ou ausência de reflexos de tendões profundos. Membros inferiores são mais acometidos do que membros superiores. Músculos faciais e orofaríngeos são infectados em 50% dos casos, e a fraqueza destes grupos musculares pode ser o sintoma inicial (WIJDICKS; KLEIN, 2017). Esta síndrome está relacionada a infecções prévias, particularmente às infecções por Arboviroses, como o “*Dengue virus*”, o “*Chikungunya virus*” e o “*Zika virus*” em adultos. A síndrome de Guillain-Barré associada ao ZIKV é usualmente transitória, com recuperação total dos pacientes (SONG *et al*, 2016).

Alguns pacientes, no entanto, necessitam ser tratados em UTI, especialmente aqueles com fraqueza orofaríngea, e respiração curta. Pode ocorrer insuficiência respiratória com fraqueza do diafragma e também desautonomia, manifestando-se como arritmias cardíacas, pressão arterial lábil e íleo adinâmico (WIJDICKS; KLEIN, 2017).

Três fenótipos de GBS são possíveis: (1) desmielinizante; (2) axonal; (3) desmielinizante com envolvimento axonal. Apesar de que ambos os constituintes da resposta imune (imunidade celular e imunidade humoral) têm

um papel na GBS, acredita-se que a GBS é mediada por anticorpos. A predominância do envolvimento motor axonal tem levado à designação de neuropatia aguda axonal motora e pacientes apresentando a variedade axonal sensorial possuem o antígeno GQb1. “As formas axonal sensorial e motora podem ser classificadas em “GBS axonal” (WIJDICKS; KLEIN, 2017).

3.6.2.2 Transmissão vertical e microcefalia

Há evidências de relação causal entre a transmissão vertical do ZIKV e teratogenicidade, mostrando tropismo do vírus pelo sistema nervoso e causando distúrbios neurológicos, como a microcefalia, por exemplo. Estudos de fetos e crianças com microcefalia detectou RNA de ZIKV na placenta; líquido amniótico e tecidos fetais; partículas virais; antígeno; genoma viral completo em tecido cerebral; e IgM de ZIKV em líquido amniótico. (LAZEAR *et al*, 2016).

Vários achados na Ultrassonografia gestacional de infecção viral fetal podem ser identificados nas 18-20 semanas gestacionais, mas microcefalia pode não ser confiável se detectável antes das 24-28 semanas de gestação e, em alguns casos, só é diagnosticada após o nascimento. Pode-se realizar também a amniocentese, quando se suspeita de infecção fetal, após 21 semanas de gestação, com aspiração do líquido amniótico. (LAZEAR *et al*, 2016).

Para Song (2016):

Microcefalia congênita é definida por : (1) nascidos vivos tendo um perímetro cefálico ao nascimento abaixo do terceiro percentil para a idade e sexo do bebê ou, (2) se o perímetro cefálico ao nascimento não está disponível, um perímetro cefálico abaixo do terceiro percentil entre as primeiras 2 semanas após o nascimento e, (3) para natimorto e abortos eletivos, tendo um perímetro cefálico inferior ao terceiro percentil para sexo e idade no momento do parto (SONG *et al*,2016).

Alguns autores definem microcefalia como um perímetro cefálico ao nascimento menor que 32cm, mais especificamente menor do que 31,5cm em meninas e 31,7cm em meninos (ARAÚJO *et al*, 2016).

Enquanto microcefalia primária ou congênita caracteriza-se por diminuição do número de neurônios na neurogênese, a microcefalia secundária ou pós-natal é determinada por diminuição das sinapses neuronais.(SONG *et al*, 2016).

A microcefalia é um importante fator de risco para disfunção motora e cognitiva. Estudos informam que infecção pelo ZIKV durante a gravidez é associada à microcefalia e outras anormalidades congênitas, tais como malformações faciais, *cútis gyrata*, hipertonia/espasticidade, hiperreflexia, entre outros. Alterações em neuroimagem foram observadas, como calcificações, ventriculomegalia e lisencefalia. Além disso, podem estar presentes perda auditiva e anormalidades oculares (como neurite óptica e alterações maculares, por exemplo). Por último, também foram registrados encefalite, meningoencefalite e mielite associados a infecção pelo ZIKV. (SONG, *et al*, 2016).

Alterações neurológicas como, por exemplo, a microcefalia, devido à infecção pelo ZIKV, ocorre menos frequentemente nos 2 trimestres finais da gestação (DUARTE *et al*, 2017). O ZIKV tende a ser mais facilmente transmitido nas idades gestacionais finais, mas tem efeitos mais graves no feto se transmitido cedo na gestação (LAZEAR *et al*, 2016). Apesar de o vírus ser eliminado pelo leite materno, a amamentação não está contra indicada, principalmente em crianças com microcefalia, porque estes neonatos necessitam do aporte nutricional fornecido pelo leite materno (DUARTE *et al*, 2017).

3.7 Transmissão

Além da transmissão por vetor, o “*Zika virus*” pode ser transmitido via transplacentária, via sexual, transfusão de sangue, transplante de órgãos e tecidos e acidentes pérfuro- cortantes. A transmissão pelo leite materno não foi comprovada, sendo que a amamentação de mães com o “*Zika virus*” não deve ser suspensa. (Ministério da Saúde, 2017).

3.8 Diagnóstico e diagnóstico diferencial

Foi proposto que um fenômeno de aumento dependente de anticorpo, com forte reação cruzada entre Dengue e ZIKV, é capaz de estimular o aumento de

anticorpos em indivíduos infectados pelo ZIKV que apresentam anticorpos contra DENV. Dessa forma, complica o diagnóstico, tratamento e controle do ZIKV. (MOTA, et al, 2016).

O diagnóstico de anormalidades neurológicas congênitas pré-natais, como a microcefalia, causadas pelo ZIKV deve ser feito baseado no Ultrassom (U.S.) obstétrico e na amniocentese. A OMS recomenda um U.S. entre 18-20 semanas de gestação. Deve-se repetir o U.S. no final do segundo trimestre ou início do terceiro trimestre, geralmente entre 28-30 semanas de gestação para excluir falso-positivos (CHIBUEZE *et al*, 2017).

Segundo MEHRJARDI, 2007, o sinal mais importante identificado pelo US obstétrico é a microcefalia, além de atrofia cerebral, com ventriculomegalia, pseudocistos, calcificações parenquimatosas, agenesia ou hipoplasia do corpo caloso, anormalidades oculares, hipoplasia cerebelar e do tronco cerebral, artrogripose e CIUR (crescimento intrauterino restrito). Se o US obstétrico revelar anormalidades fetais sugestivas de infecção pelo ZIKV, a IRNM (Imagem por Ressonância Nuclear Magnética) pode ser útil para a avaliação mais precisa para as estruturas cerebrais e o líquido amniótico pode ser examinado para detectar a presença de RNA viral usando a técnica de rRT-PCR (transcrição reversa em tempo real de reação em cadeia de polimerase).

Em casos suspeitos de mielite, encefalite, meningoencefalite e meningite, causados pelo ZIKV, amostras de LCR (Líquido cefalorraquidiano), sangue e urina devem ser submetidas para teste molecular e sorologia. Para as síndromes pós-infecciosas, como a Síndrome de Guillain-Barré (GBS), o vírus pode ser indetectável. Apesar disso o soro, urina e o LCR (líquido cefalorraquidiano) devem ser submetidos para rRT-PCR e o LCR (LANDRY; GEORGE, 2017).

De acordo com GRANGER *et al*, 2017, a avaliação sorológica inicial para a infecção pelo ZIKV inclui uma captação do anticorpo IgM por MAC-ELISA (Ensaio Imunoenzimático Ligado à Enzima), seguido por teste de neutralização da redução da placa (PRNT). Anticorpos IgM para o ZIKA pelo método do MAC-ELISA podem ser detectáveis 4-5 dias após o início dos sintomas, mas os títulos são confiáveis a partir de 2 semanas, quando atingem um pico. Os

anticorpos tornam-se indetectáveis em 12-14 semanas. Baseado nisso, para pacientes com menos de 2 semanas de sintomas e gestantes com ou sem sintomas entre 2 semanas da última exposição, o CDC (Center of Disease Control) recomenda a realização de transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR) para detecção do RNA do ZIKV no sangue e urina. Para pacientes sintomáticos e gestantes além de 2 semanas, o CDC recomenda sorologia para anticorpos IgM para ZIKV via MAC-ELISA. Devido à possibilidade de reação cruzada de anticorpos entre outros *Flavivirus*, testes de PRNT é necessário para todas as amostras reativas para ZIKV no MAC-ELISA.

Apesar da IgM poder permanecer por vários meses, sua detecção é apenas confiável por 12 meses após o início dos sintomas. Dessa forma, a avidéz pelo IgM ou IgG testa a exclusão da detecção ou infecção recente (YANG, *et al*, 2017).

Resultados negativos na sorologia e na PCR em gestantes excluem infecção, a não ser que a amostra tenha sido coletada muito antes da detecção de IgM ou muito após a detecção por PCR. PCR positiva no líquido amniótico sugere infecção no feto (LANDRY; GEORGE, 2017).

O método diagnóstico MAC-ELISA é usado para a detecção qualitativa de anticorpos IgM de ZIKV do soro ou LCR. Amostras coletadas precocemente no curso da infecção devem também ser testadas por rRT-PCR e, se negativas, o soro na fase de convalescência deve também ser testado (LANDRY; GEORGE, 2017).

O Euroimmun ELISA é um ELISA indireto baseado no antígeno NS1 do ZIKV, enquanto o InBios ELISA usa a glicoproteína E recombinante do ZIKV (GRANGER, *et al*, 2017). Enquanto os anticorpos para a proteína E sofrem reação cruzada entre ZIKV, DENV e WNV, anticorpos para a proteína NS1 parecem ser mais específicos, possivelmente devido às diferenças eletrostáticas únicas na superfície da alça NS1 permitindo desenvolvimento da especificidade do anticorpo (GRANGER, *et al*, 2017)

Apesar da sorologia ser o método diagnóstico mais comum de infecção recente e antiga, testes de anticorpos apresentam reação cruzada devido a uma

sequência e homologia estrutural entre proteínas de superfície do ZIKV e outros *Flavivirus*, particularmente DENV (LANDRY; GEORGE, *et al*, 2017).

qRT-PCR tem a vantagem de promover uma detecção rápida e sensível do patógeno. No presente, os primers disponíveis não cobrem a diversidade genética e distribuição geográfica de todas as linhagens do ZIKV. Todavia, o ZIKV possui uma grande diversidade genética mesmo entre a mesma linhagem e região (YANG, *et al*, 2017).

Segundo GRANGER *et al*, 2017, PRNT não distingue se os anticorpos dos *Flavivirus* são específicos do DENV ou do ZIKV. Enquanto PRNT é altamente específico em casos de flavivirose primárias, infecções secundárias por *Flavivirus* frequentemente estimula o antígeno original, levando a reação cruzada de *Flavivirus* próximos. Devido à esta co-circulação de DENV e ZIKV, não se pode confiar na acurácia da distinção entre *Flavivirus*.

A co-circulação e a co-infecção de arboviroses estão se tornando mais comuns. Apesar de a maioria dos casos de ZIKV ser assintomática, a maioria dos casos de ZIKV pode ser facilmente confundida com infecções pelo CHIKV e pelo DENV, o que requer um critério mais sensível e específico para a definição de casos suspeitos, para evitar erros no diagnóstico (principalmente nos estágios iniciais das doenças), de notificação, e distorção da análise do comportamento das arboviroses (BRAGA *et al*, 2017; MONDOLFI *et al*, 2016).

Alguns arbovírus possuem sinais e sintomas típicos que sugerem um diagnóstico, mas não são confiáveis. Apesar de artralgia ser considerada característica do CHIKV, devido à sua intensidade e longa duração (40% das artralgias no CHIKV duram meses ou até anos), ela também é encontrada em outras arboviroses. Febre baixa, conjuntivite não purulenta e malformações congênitas estão associadas ao ZIKV, assim como febre alta, anorexia, petéquias, dor retro-orbitária e diátese hemorrágica serem características do DENV. (Quadro 1)

Sinais/Sintomas	Dengue	Zika	Chikungunya
Febre (duração)	Acima de 38°C (4 a 7 dias)	Sem febre ou subfebril 38°C (1-2 dias subfebril)	Febre alta > 38°C (2-3 dias)
Manchas na pele (Frequência)	A partir do 4º dia (30-50% dos casos)	Surge no 1º ou 2º dia (90-100% dos casos)	Surge 2-5 dia (50% dos casos)
Dor nos músculos (Frequência)	+++ /+++	++ /+++	+ /+++
Dor na articulação (frequência)	+ /+++	++ /+++	+++ /+++
Intensidade da dor articular	Leve	Leve/Moderada	Moderada/Intensa
Edema da articulação	Raro	Frequente e leve intensidade	Frequente e de moderada a intenso
Conjuntivite	Raro	50-90% dos casos	30%
Dor de cabeça (Frequência e intensidade)	+++	++	++
Cocceira	Leve	Moderada/Intensa	Leve
Hiperfófia ganglionar (frequência)	Leve	Intensa	Moderada
Díscrasia hemorrágica (frequência)	Moderada	Ausente	Leve
Acometimento Neurológico	Raro	Mais frequente que Dengue e Chikungunya	Raro (predominante em Neonatos)

Fonte: Carlos Brito – Professor da Universidade Federal de Pernambuco



blog.saude.gov.br



/minsaude

Quadro 1- Diagnóstico diferencial entre ZIKV, DENV e CHIKV

Observar os principais sinais e sintomas e a intensidade dos mesmos nas infecções pelo ZIKV, DENV e CHIKV.

3.9 Tratamento das infecções causadas pelos *Flavivirus*

3.9.1 Introdução

Para o tratamento dos *Flavivirus* e do ZIKV, têm-se estudado medicamentos com mecanismos de ação diferentes. Drogas anti ZIKV com alvo na inibição da adsorção do ZIKV na superfície da célula do hospedeiro, da proteína helicase, nucleosídeos, inibidores da proteína NS3, pequenas moléculas como terapia, inibidores da metiltransferase, interferons, reposição de medicamentos já utilizado em clínica médica (como a cloroquina e o sofosbuvir), drogas desenvolvidas com o auxílio de computadores, anticorpos neutralizantes, soros de convalescência, anticorpos que limitam aumento dependente de anticorpos e medicamentos naturais (MUNJAL *et al*, 2017). No presente texto, analisaremos os medicamentos antivirais naturais ou sintéticos originais, ou

ambos, sugeridos como segundo uso (reutilização) medicamentoso para o tratamento de *Flavivirus*, com ênfase em ZIKV (MUNJAL *et al*, 2017).

3.9.2 Medicamentos antivirais naturais - as Curcuminas, os Flavonóides e as Carrageninas

O genoma do ZIKV é traduzido em uma poliproteína, que é clivada em 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não estruturais. O processamento correto da poliproteína é essencial para replicação de todos os *Flavivirus*, as proteases dos hospedeiros e as proteases NS2B-NS3 virais (NS2B-NS3-pro) e suas propriedades fazem os NS2B-NS3-pro dos *Flavivirus* um bom alvo para o desenvolvimento de drogas antivirais (ROY *et al*, 2017). Segundo ROY e colaboradores, algumas pequenas moléculas inibem as enzimas NS2B-NS3-pro em plantas comestíveis, incluindo chás, cebola vermelha, brócolis e pimenta verde (a Curcumina e os flavonóides são ricos nessas plantas comestíveis). Cinco flavonóides e um derivado do fenol mostraram inibir estas enzimas (ROY *et al*, 2017).

Curcumina, um aditivo alimentar, é capaz de introduzir a infectividade do ZIKV por impedir a adsorção viral, que ocorre na superfície da célula do hospedeiro, sem efeitos adversos na viabilidade celular (MUNJAL *et al*, 2017). Curcumina exerce um efeito inibitório maior que a Quercetina. O anel fenil da Curcumina tem um ligante mais longo e, assim como os flavonóides, tem a formação de ligação de hidrogênio com Gln74 e Gly124, enquanto outro anel fenil tem contatos adicionais com ligações de hidrogênio com Asp122 e Ile165 (ROY *et al*, 2017).

Os flavonóides fazem parte de um grupo de substâncias naturais que estão presentes em vegetais, grãos, raízes, chá e vinho. Esses derivados de benzopirona estão amplamente distribuídos nas plantas comestíveis. Um estágio da replicação que pode ser inibida por flavonóides é a síntese de RNA viral. Flavonóides têm sido relacionados a atividades antivirais e imunomoduladoras. Flavonóides também têm se mostrado eficazes em aumentar a sensibilidade do IFN tipo 1, o qual é responsável por sua atividade antiviral (ABUBAKR; SUBASH; BARNEJEE, 2013). Cinco flavonóides têm funções inibitórias diferentes e específicas. O Miricetin tem efeito inibitório

máximo, enquanto o Apigenin, mínimo. Por outro lado, a Quercetina e a Luteolina têm o mesmo efeito inibitório. Um composto fenólico natural, a Curcumina, tem um efeito significativo. Miricetin e Quercetina ligam-se mais intensamente no DENV do que no ZIKV.

Flavonóides	Inibem a síntese de RNA viral
	Imunomoduladores
	Aumentam a sensibilidade do interferon tipo 1
	Inibem as enzimas NS2B-NS3-protease

Tabela 2- a tabela mostra 4 mecanismos da ação antiviral dos flavonóides.

O Miricetin, um inibidor mais eficaz, estabelece três ligações de hidrogênio com quatro resíduos de ZIKV NS3-pro. Prótons de grupos 3', 4' hidroxil no anel fenil formam duas ligações de hidrogênio da cadeia lateral NH de Asn152. Dessa forma, o anel 3'hidroxila no anel benzopiran forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio da cadeia lateral de Gln74, enquanto um grupo 7-hidroxila no anel benzopiran forma uma ligação de hidrogênio no átomo de nitrogênio na cadeia posterior de Gly124 (ROY *et al*, 2017).

A Luteolina estabelece uma única ligação de hidrogênio com resíduos de NS2B-NS3-pro do ZIKV como a Quercetina, exceto pela perda de ligação de hidrogênio com Gln74 devido à ausência de grupo 3'-hidroxila em Luteolin (ROY *et al*, 2017).

Na Apigenina, a ausência do grupo 3'hidroxila no anel fenil resulta em perda da ligação de hidrogênio entre o grupo 3'hidroxil do anel fenil e da cadeia lateral do átomo de oxigênio da Lys73. Essa ligação de hidrogênio é responsável pelo maior efeito inibitório que a Luteolina (ROY *et al*, 2017).

A Isorhamnetina e a Curcumina têm o mesmo grupo 3'metoxi e 4'hidroxi nos anéis fenil, assim como sítios ligantes bivalentes, mas a Curcumina recebe uma atividade inibitória que é muito maior que a da Isorhamnetina. Uma alta

afinidade é obtida através do estabelecimento de sítios ligantes bivalentes e multivalentes, tendo como interações bivalentes o inibidor trombina.(ROY *et al*, 2017).

A Quercetina é benéfico em inibir a atividade enzimática do NS2B- NS3-pro de maneira dose-dependente (MUNJAL *et al*, 2017). A ausência do grupo 5'hidroxil no anel fenil da Quercetina faz com que falte uma ligação de hidrogênio entre um átomo de oxigênio de grupos 5'-hidroxil e a cadeia lateral NH de Asn152, o que pode explicar pelo menos parcialmente por sua leve afinidade comparando com Miricetin. Certamente, devido à reposição de um próton de um grupo 3'hidroxil da Quercetina por um grupo metil em Isorhamnetina, a ligação de hidrogênio entre um próton de grupo 3'hidroxil e oxigênio de Lys73 é perdida. Essa ligação de hidrogênio parece contribuir para a atividade inibitória.

Dessa forma, o número de grupos hidroxila no anel fenil é um determinante para uma atividade inibitória. Para flavonóides, a presença de anéis benzopiran e a posição de conexão do anel fenil são críticos para a atividade inibitória. Enquanto flavonóides se ligam de forma similar ao NS2B-NS3-pro, a Curcumina pode ter uma ligação adicional fora deste sítio. Além disso, ZIKV NS2B-N3-pro parece ser altamente susceptível à inibição alostérica, assim como em outros complexos de *Flavivirus* NS2B-NS3-pro. Figura 4.

As Carrageninas naturais (famílias de polissacarídeos lineares sulfatados obtidos a partir de algas marinhas) têm sido associadas à atividade antiviral contra vírus envelopados, incluindo HSV-1, HSV-2 e DENV 2. Esses vírus interagem com a glicosaminoglicana, sulfato de heparina como seus ligantes iniciais da célula do hospedeiro (ABUBAKR; SUBASH; BARNEJEE, 2013). A Carragenina *Meristiella gelidium* tem-se mostrado o mais potente polissacarídeo sulfatado. Essa atividade antiviral de polissacarídios sulfatados tem sido atribuída a interação do polissacarídeo com a glicoproteína viral, prevenindo assim a entrada do vírus na célula do hospedeiro, o mesmo tipo de interação que ocorre entre glicoproteínas virais e glicosaminoglicanas, particularmente com sulfato de heparina, presente na superfície da célula do hospedeiro. Similarmente, as galactomananas *Mimosa scabrella* e *Leucaena*

leucocephala têm mostrado boa ação inibitória para YFV e DENV 1 (ABUBAKR; SUBASH; BARNEJEE, 2013).

Novobiocin é um antimicrobiano anticoumarin que é produzido por um actinomiceto *Streptomyces niveus*, e que exerce seu efeito anti-bacteriano (principalmente contra *Staphylococcus sp.*) que tem como alvo a subunidade GyrB da DNA girase da bactéria para inibir, competitivamente, a reação adenina trifosfatase catalisada por GyrB. Novobiocin é categoria C na gestação (YUAN *et al*, 2017). O novobiocin é hoje utilizado como método laboratorial para fazer a distinção das espécies de *S. aureus* coagulase negativos, que são resistentes à novobiocina nas culturas (DONELLY; BLAGG, 2008). O novobiocin não está disponível para uso clínico, mas, por ser um inibidor da protease NS2B-NS3, pode ter um papel no ZIKV.

Para melhor caracterizar as alterações estruturais entre Novobiocin e ZIKV NS2B-NS3 proteases, moléculas de encaixe foram produzidas para prever o risco de ligação de Novobiocin com as proteínas NS2B-NS3 do ZIKV (COUTARD *et al*, 2017). Três hidrogênios ligantes foram formados entre o ligante e a proteína através de resíduos de MET51, SER81, LYS54 e amplas áreas de estabilização hidrofóbicas foram formadas entre o composto e os resíduos HIS51 e VAL155. Portanto, 2 desses resíduos interativos (SER81 e HIS51) também têm sido identificados por conter resíduos entre o inibidor de Boro cn-716 e as proteínas do ZIKV NS2B e NS3. Concluindo, Novobiocin (Catamicina), como inibidor de protease cn-761 pode também afetar a eficiência catalítica de ZIKV NS2B-NS3 (YUAN *et al*, 2017).

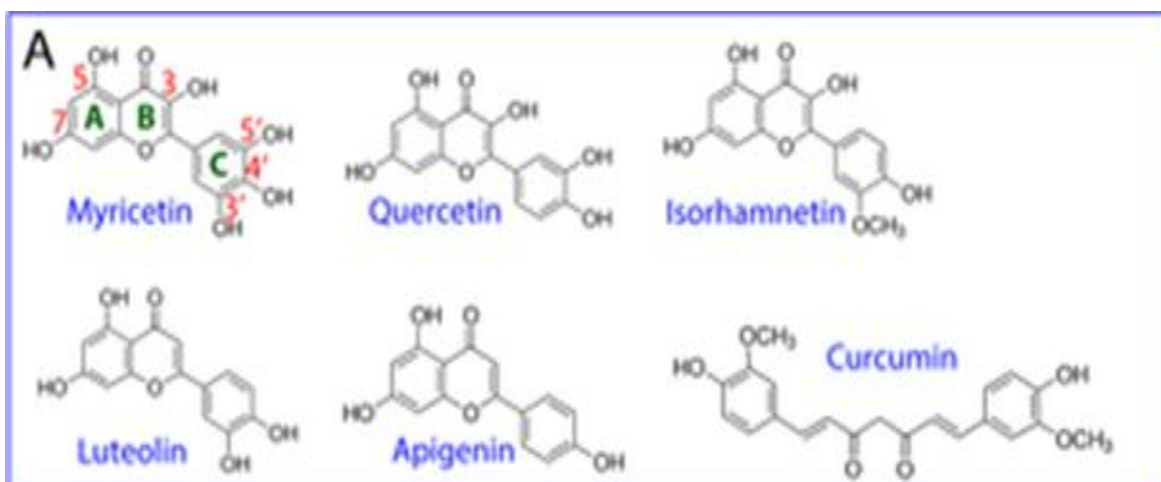


Figura 4- Estrutura química dos flavonóides

Estão mostradas as estruturas químicas da Miricetin, Quercetina, Isorhamnetina, Luteolina, Apigenina e do composto fenólico Curcumina.

3.9.3 Proteínas cinases e tirosinases

As proteínas cinases (PK) são alvos de drogas antivirais contra *Flavivirus*. As PK são responsáveis pela fosforilação de proteínas nas células, ao transferir um grupo fosfato de um ATP para um ou mais resíduos de aminoácidos de uma proteína, enquanto as fosfatases regulam esta fosforilação. As PK são componentes estruturais que atuam na manutenção e controle da homeostase em eucariotos (SILVA *et al*, JERRFEY *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009).

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MPK) pertencem à família das serinas-treoninas cinases e regulam funções fundamentais da célula, como proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose (JEFFREY *et al*, 2017).

As MAPK são reguladas por cascatas de fosforilação, constituindo uma via de ativação em sequência e são compostas de, no mínimo, 3 proteínas: MAPK cinase cinase (MAPKKK), MAPK cinase (MAPKK) e MAPK (COWAN; STOREY, 2003).

Uma das principais cascatas de sinalização é a via Ras-Raf MEK-ERK na qual participa uma pequena proteína G (Ras) e três proteínas cinases (Raf, MEK1/2, ERK1/2) e o ponto de partida de ativação dessa via inicia-se após estímulos desencadeados por mitógenos, fatores de crescimento e citocinas, resultando em uma resposta biológica específica. (SILVA *et. al*, 2007; ZHAO; ADJEI, 2014). Os substratos da ERK 1/2 são proteínas citosólicas, proteínas de membrana, substratos nucleares como fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto e PK (SILVA *et al*, 2007; ZHAO; ADJEI, 2014).

As tirosinas cinases são receptoras citoplasmáticas e tirosina cinase receptora (proteínas transmembranas ativadas por um ligante extracelular)(SILVA *et al*, 2009) As proteínas cinases da família de Src (SPK) representam a maior família de tirosinas cinases não receptoras e é composta por 9 membros ((c-

Src, c-Yes, Fyn, c-Fgr, Lyn, Hck, Lck, Blk, Frk) e participam de vários processos celulares (HUBBARD; TILL, 2000)

O tráfego da membrana depende, em parte, de interações entre proteínas adaptadoras (AP1 a AP5) e da carga transmembrana (BECKERMAN *et al*, 2017). A Ap5, AP1 e AP2 associadas à Clatrina são complexos heterotetrâmico, que orquestram a formação de vesículas destinadas para o transporte bidirecional na via secundária e endocitose, respectivamente. As duas cinases celulares do hospedeiro, AP2 associados a proteína cinase 1 (AAK1) e ciclina G associado à cinase (GAK) regulam o transporte de endocitose e rede trans golgi receptor mediado (BECKERMAN *et al*, 2017).

AAK1 e GAK no ciclo de multiplicação do DENV via regulação de 2 passos distintos de APs dependem de Clatrina: penetração e produção de vírus infectante (BECKERMAN *et al*, 2017).

3.9.4 Drogas sintéticas ou drogas reutilizadas como segundo uso medicamentoso para o tratamento de *Flavivirus* com ênfase no ZIKV

3.9.4.1 Drogas que inibem a adsorção viral

Segundo o autor BECKERMAN *et al*, 2017, AAK1 e GAK são potenciais alvos que podem ser inibidos para o tratamento de *Flavivirus*. Exemplos de drogas com este potencial são o Sunitinib e o Erlotinib.

O Sunitinib pode ser utilizado no câncer de células renais metastático, produzindo uma maior taxa de resposta (31%) e uma sobrevida mais longa sem progressão da doença do que qualquer outro agente antiangiogênico aprovado pelo F.D.A. O Sunitinib também foi aprovado para o carcinoma de células renais avançado (BRUNTON; KNOLLMANN, 2012)

O Erlotinib foi aprovado pela F.D.A. para tratamento de segunda linha em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas localmente avançado ou metastático. O Erlotinib inibe competitivamente a ligação do ATP ao sítio ativo da cinase (BRUNTON; KNOLLMANN, 2012).

As drogas Sunitinib e Erlotinib afetam a multiplicação do DENV, exercendo ação antiviral. Segundo o autor BECKERMAN *et al*, 2017, foi identificada interferência precisamente com os passos de inibição da via silenciadora de

RNA contra AAK1 e GAK. Esse fenótipo sugere a hipótese de que a inibição do AAK1 e GAK contribui com o efeito anti-DENV dessas drogas. Enquanto o alvo do Erlotinib é o GAK, com maior afinidade por outras cinases, Sunitinib é um inibidor de cinases com maior espectro (inibe, principalmente AAK1) (BECKERMAN *et al*, 2017).

A combinação de Sunitinib-Erlotinib exerce sinergismo e pode ser utilizada para tratar co-infecção pelo DENV-CHIK e DENV-ZIKV (BECKERMAN *et al*, 2017).

Inibição simultânea de várias cinases ou ataque a várias vias pelas mesmas drogas ou combinação delas podem provar atração em combater patógenos virais, assim como ocorre no câncer (BECKERMAN *et al*, 2017).

3.9.4.2 Drogas inibidoras da NS2B-NS3-protease

Uma outra abordagem para a terapia antiviral contra o ZIKV é a reutilização de medicamentos com alvo nas enzimas contra o ZIKV, incluindo protease, helicase ou polimerase. Todavia, apesar de a maioria destas drogas ser aprovada clinicamente por ter ação antiviral e anti-câncer e essas drogas funcionarem como imunomoduladores e imunossupressores, são contraindicadas na gestação (Categoria D) (YUAN *et al*, 2017).

Lopinavir-ritonavir são inibidores da protease NS2B- NS3, possuem bom perfil de efeitos colaterais e podem ser utilizados na gestação (Categoria C) e em pacientes com complicações graves associadas ao ZIKV para testes *in vitro*. (YUAN *et al*, 2017).

O lopinavir é atualmente formulado apenas em associação com o ritonavir, que inibe o metabolismo do lopinavir mediado por CYP3A, resultando, desta forma, em exposição aumentada do fármaco (KATZUNG; TREVOR, 2017) Em estudos clínicos comparativos, o lopinavir possui atividade antirretroviral pelo menos comparável àquela de outros inibidores da protease (BRUNTON; KNOLLMANN, 2012)

O ritonavir é um potente inibidor da CYP3A4, resultando em numerosas interações medicamentosas potenciais. Entretanto, essa característica tem sido utilizada com vantagem quando o ritonavir é administrado em baixas doses em associação a qualquer um dos outros agentes inibidores da protease, visto que

os níveis sanguíneos elevados destes últimos possibilitam uma dose mais baixa ou menos frequente (ou ambas) com maior tolerabilidade e potencial de maior eficácia contra vírus resistentes. (KATZUNG; TREVOR, 2017). O lopinavir e ritonavir são muito utilizados no tratamento do HIV.

O Bortezomibe foi aprovado pelo FDA como terapia inicial para o mieloma múltiplo e como terapia para o MM após recidiva com outros fármacos (Kane e cols., 2003). O Bortezomibe também teve o seu uso aprovado para o linfoma de células do manto refratário ou que sofre recidiva (BRUNTON; KNOLLMANN, 2012).

Este antineoplásico inibidor da protease viral age potencialmente bloqueando vias pós-apoptóticas no câncer tem sido usado com antiviral para ZIKV. Dessa forma, agentes anti-câncer utilizados na medicina (inibidores da cinase e tirosinase) com baixa toxicidade podem prover oportunidades para tratar infecção pelo ZIKV (CHENG; MURRAY; RUBIN; 2016).

3.9.4.3 Análogos de nucleosídeos

Análogos de nucleosídeos são uma classe de antivirais comumente usados na terapia para infecções virais humanas, incluindo AIDS, Hepatite B, Citomegalovírus e vírus da Herpes Simples. Esses agentes são especialmente seguros e bem tolerados desde que tenham um alvo viral, mas não polimerases celulares, e cursem com terminação pré-matura de ácido nucléico viral (EYER *et al*, 2016).

Análogos de nucleosídeos podem ter como alvo RdRp para terminar a replicação do RNA viral depois da incorporação na cadeia do RNA viral à montante. Como as células humanas não possuem RdRp, essa classe de enzimas parece ser um dos mais promissores alvos para antivirais que usam RdRp para replicação. Cinco compostos exemplificam os análogos de nucleosídeos: 7'-deaza-2'; c-methyladenosina; 2'-c-methyladenosina; c-methylcystidina; 2'-c-methylguanosina e 2'-c-methyluridina (EYER *et al*, 2016).

Segundo Eyer *et al*, 2016, o composto 2'-c-methyl substituinte para o nucleosídeo resultou em inibição da replicação do Zika in vitro. Além disso, a

introdução de guanina e uridina na molécula de nucleosídeo reduziu a atividade anti-Zika in vitro.

O Sofosbuvir é um análogo de nucleosídeo que inibe a RNA polimerase do HCV dependente de RNA NS5 em pacientes infectados pelo HCV dos genótipos 1, 2, 3 ou 4 (KATZUNG; TREVOR, 2017).

Sofosbuvir é uma uridina nucleosídeo pró-droga, que é trifosfatada dentro de células, para inibir a RNA polimerase, tendo como alvo resíduos de aminoácidos. Essa droga também se torna ativa em células tronco neuroepiteliais. O Sofosbuvir inibe a replicação de ZIKV e é dose dependente (Sacramento *et al*, 2017).

Segundo Sacramento *et al*, 2017, células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) derivadas de células tronco neuronais, foram infectadas com o ZIKV e tratadas com Sofosbuvir. Este reduziu replicação viral e células tronco neuronais afetando a neuro-patogênese do ZIKV mediada por indução de morte celular. Isso indica que Sofosbuvir é efetivo contra ZIKV em células neuronais com relevância a fisiopatologia do vírus. O Sofosbuvir é aprovado pelo F.D.A. para o tratamento de hepatite C e é categoria B na gestação.

Ribavirina é um análogo da guanosina que sofre fosforilação intracelular por enzimas da célula hospedeira e parece interferir na síntese de trifosfato de guanosina, inibir o capeamento do RNA mensageiro viral e inibir também a polimerase dependente de RNA viral de certos vírus. O trifosfato de Ribavirina inibe a replicação de uma ampla variedade de vírus de DNA e de RNA, inclusive vírus influenza A e B, vírus parainfluenza, vírus sincicial respiratório, paramixovírus, HCV, HIV-1 (KATZUNG; TREVOR, 2017) e *Flavivirus* (BRUNTON; KNOLLMANN, 2012).

Ribavirina pode inibir a replicação de DENV, o que sugere que a Ribavirina pode ser efetiva contra vírus de RNA, como o ZIKV (KAMIYAMA *et al*, 2017). Além disso, a Ribavirina em altas concentrações inibe o “*West Nile vírus*” “in vitro”, porém não se dispõe de dados clínicos (KATZUNG; TREVOR, 2017)

Segundo Kamiyama, *et al*, 2017, a combinação de Ribavirina com interferon beta, assim como a Ribavirina sozinha inibe a replicação de ZIKA “in vitro”. A Ribavirina é contraindicada na gravidez.

3.9.4.4 Cloroquina/Mefloquina

Já a Cloroquina fosfato/hidrocloro (CQ) é uma droga utilizada para o tratamento de malária e doenças autoimunes. Esta droga foi sugerida para inibir a infecção pelo Zika em vários modelos, incluindo células precursoras neuronais humanas (NPCs) derivadas de iPSCs. Segundo SHIRYAEV *et al*, 2017, CQ também mostrou inibir a autofagia e propagação de ZIKV em camundongos deficientes em sinalizadores de interferon.

CQ é conhecida por afetar a acidificação de endossomos de célula infectada pelo ZIKV e então obstrui a fusão da proteína do envelope com a membrana do endossomo. Proteases celulares, incluindo a furina, são essenciais para a clivagem do prM do *Flavivirus* durante a liberação do vírus. Essa transição é pH dependente, e alterações no pH intracelular pode resultar na liberação de menos vírion infectantes (SHIRYAEV *et al*, 2017).

A farmacocinética da CQ o faz um excelente candidato para profilaxia em indivíduos de alto risco de contrair infecção pelo ZIKV (residentes e visitantes em áreas endêmicas). O autor demonstra que CQ reduz a infecção pelo ZIKV em 2 modelos de camundongos e, em doses compatíveis ou menores que aquelas amplamente usadas em humanos podem marcadamente reduzir infecção materna e fetal (SHIRYAEV *et al*, 2017).

A mefloquina é utilizada para a prevenção e o tratamento da malária causada por *P falciparum* e *P vivax* resistentes a fármacos, porém não é mais considerada como tratamento de primeira linha na maioria dos contextos clínicos. O fármaco é especialmente útil como um agente quimioprolático para viajantes que passam semanas, meses ou anos em áreas onde essas infecções são endêmicas (BRUNTON; KNOLLMANN, 2012).

Mefloquina, além de antimalárico, também tem ação anti-câncer, anti-tuberculose e anti-viral. Como a Mefloquina é altamente lipofílica, ela penetra

na barreira hemato-encefálica e atinge o sistema nervoso central (SNC). A atividade antiviral e lipofílica da mefloquina faz com que ela seja estudada para tratar vírus neutrotrópicos, incluindo ZIKV (LIMA *et al*, 2016).

3.9.4.5 Outras drogas

A Niclosamida é uma droga aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) por tratar infecções pelos cestódeos que tem mostrado ser de amplo espectro para o tratamento anti-câncer principalmente por inibição da fosforilação oxidativa (CHENG; MURRAY; RUBIN, 2016). A niclosamida, um derivado halogenado da salicilanilida, foi introduzida na década de 1960 para uso humano como tenicida. Esse fármaco era considerado a segunda opção (depois do praziquantel) para o tratamento das infecções intestinais humanas por *Taenia saginata*, *Diphyllobothrium latum*, *Hymenolepis nana* e a maioria dos outros cestódeos (BRUNTON; KNOLLMANN, 2012). Este medicamento mostrou-se útil para o tratamento do ZIKV por este ter uma via metabólica comum com o câncer e o fato de a niclosamina ser um anti-cancerígeno.

Lovastatina é uma estatina, tendo assim ação hipolipemiante em pacientes com hipercolesterolemia, para reduzir o risco cardiovascular. Segundo os autores PASCOALINO; COURTEMANCHE; CORDEIRO, 2016, um ensaio clínico testou a eficiência de um tratamento de pacientes com DENV com Lovastatina, desde que os efeitos estabilizantes do endotélio poderiam diminuir a vasculopatia relacionada ao DENV (PASCOALINO; COURTEMANCHE, CORDEIRO, 2016).

6-Azauridine é administrada como um produto triacetilado, Azaribine, um antimetabólito capaz de inibir ambas multiplicações de DNA e RNA. 6-Azuridine foi retirado do uso em clínica médica devido a episódios tromboembólicos arteriais e venosos em alguns pacientes com psoríase. Apesar disso, 6-Azauridine foi relatado ter amplo espectro de ação contra *Flavivirus*, incluindo ZIKV (PASCOALINO; COURTEMANCHE; CORDEIRO, 2016).

Palonosetran é um bloqueador do receptor de serotonina 5HT₃, usado para prevenir náuseas e vômitos induzidos por agentes quimioterápicos. (PASCOALINO; COURTEMANCHE; CORDEIRO, 2016). Palonosetron é uma droga promissora. Pode ser administrada por via oral ou intravenosa, em humanos a biodisponibilidade é muito alta (97%), a meia vida é muito longa (40h), ela ultrapassa a barreira hemato-encefálica, sendo um bom candidato para infecções por *Flavivirus* (PASCOALINO; COURTEMANCHE; CORDEIRO, 2016).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Modelos experimentais para o tratamento de doenças por *Flavivirus*, incluindo o ZIKV, estão em andamento. Este trabalho mostrou os principais alvos de uma potencial terapia contra os *Flavivirus*, como as proteases, a RdRp, a helicase e as cinases. Mostrou, também, os mecanismos destes alvos na patogênese do ZIKV e as principais drogas que podem vir a ser utilizadas no tratamento dos *Flavivirus*.

As contribuições do trabalho realizado colocam-se na direção de mobilizar a comunidade acadêmica sobre a importância dos *Flavivirus*, principalmente do ZIKV, devido tanto à sua prevalência quanto à frequência de complicações neurológicas associadas a esta doença, além de mostrar os potenciais tratamentos em investigação.

Novas pesquisas poderiam ser realizadas também sobre Alphavirus, especialmente sobre o "*Chikungunya virus*". Isto se deve ao fato de que o vírus citado co-circula com o vírus da DENV e do ZIKV em várias regiões, principalmente porque os três dependem do mesmo vetor, o *Aedes sp.*, e encontram ambientes climáticos semelhantes para este sobreviver.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKR, M. D.; SUBHASH, C. M.; BARNEJEE, S. Natural compounds against flavivirus infections. **Natural Product Communication**, Westerville, v. 8, n. 10, p. 1487-1492, 2013. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/257925348_Natural_Compounds_against_Flaviviral_Infections> Acesso em: 24 jul. 2017.

AGUIAR, M. C. A. M. Análise de vias sinalizadoras celulares como potenciais alvos antivirais: papel exercido no ciclo de multiplicação do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV). 2017. 102 f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017> Acesso em: 10 nov. 2017.

ARAÚJO, A. Q. C.; SILVA, M. T. T.; ARAÚJO, A. P. Q. C. Zika vírus-associated neurological disorders: a review. **Brain**, Oxford, v. 139, n. 8, p. 2122-2130, Aug. 2016. Disponível em:< <https://academic.oup.com/brain/article/139/8/2122/1754016>> Acesso em: 30 out. 2017.

ARIAS, N. E. C. Modelo de infecção em camundongos balb/c infectados por via periférica pelo vírus da encefalite de Saint Louis: padronização, avaliação e validação para utilização no teste de potenciais antivirais. 2017. 44 f. (Projeto de pesquisa de mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017> Acesso em: 10 nov. 2017.

BARBOSA-LIMA, G. *et al.* 2,8-bis (tryfluoromethyl) quinoline analogs show improved anti Zika vírus activity, compared to mefloquine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 334-340, Feb. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416310649?via%3Dihub>> Acesso em: 20 nov. 2017

BEKERMANN, E. *et al.* Anticancer kinase inhibitors impair extracellular viral trafficking and exert broad -spectrum antiviral effects. **J. Clin. Invest.**, v. 127, n. 4, p. 1338-1352, Apr. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5373883/>> Acesso em: 20 nov. 2017

BRAGA, J. U. *et al.* Accuracy of zika vírus disease case definition during simultaneous dengue and chikungunya epidemics. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v. 12, n. 6, p. 1-14, jun. 2017. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179725>> Acesso em: 18 nov. 2017. Acesso em 3 nov. 2017.

BRUNTON; A.C; KNOLLMANN, C.K. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12ª edição. Porto Alegre. Editora: Artmed, 2012> Acesso em: 3 dez, 2017.

CAMARA, D. C. P. Seasonal differences in density but similar competitive impact of *Aedes albopictus* (Skuse) on *Aedes aegypti* (L.) in Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v. 11, n. 6, jun. 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157120>> Acesso em: 5 Ago. 2017

CHENG, F.; MURRAY, J. L.; RUBIN, D. H. Drugs repurposing: new treatments for zika vírus infection? **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, UK, v. 22, n. 11, p. 919-921, Nov. 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491416301216>> Acesso em: 18 de nov. 2017.

CHIBUEZE, E. C. *et al.* Diagnosis accuracy of ultrasound scanning for prenatal microcephaly in the context of zika virus infection: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 2310, p. 1-10, May 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-01991-y.pdf>> Acesso em: 22 ago. 2017

DUARTE, G. *et al.* Zika virus infection in pregnant women and microcephaly. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 5, p. 235-248, jun. 2017. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.1055/s-0037-1603450>> Acesso em: 28 ago. 2017.

EYER, L. *et al.* Nucleoside inhibitors of Zika vírus. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 707-711, Sept. 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/214/5/707/2237964> Acesso: 21 de nov. 2017.

FREITAS, A. R. R. *et al.* Introduction and transmission of zika virus in Brazil: new challenges for the americas. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 58, 24, p. 1-2, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652016005000600&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 29 ago. 2017.

GRANGER, D. *et al.* Serologic testing for Zika virus: comparison of three Zika virus IgM-Screening enzyme-linked immunosorbent assays and initial laboratory experiences. **J. Clin. Microbiol.**, v. 55, n. 7, p. 2127-2136, July 2017. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/55/7/2127>> Acesso em: 4 de out. 2017

GUIMARÃES, M. Zika teria chegado ao nordeste um ano e meio antes de ser detectado. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, v.19, n.13, maio 2017. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2017/05/25/zika-teria-chegado-ao-nordeste-um-ano-e-meio-antes-de-ser-detectado/>> Acesso em: 17 de set. 2017.

HEUKELBACH, J. *et al.* Zika vírus outbreak in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries**, v.10, n. 2, p. 116-120, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

26927450> Acesso em: 3 de jul. 2017

HOU, W. *et al.* Determination of the cell permissiveness spectrum, mode of RNA replication, and RNA-protein interaction of Zika virus. **BMC Infect. Dis.**, v.17, n. 239, p. 1-12, 2017. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5374689/>> Acesso em: 2 out. 2017.

IOOS, S. *et al.* Current Zika vírus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 44, n. 7, p. 302-307, July. 2014. Disponível em:

<

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X14001085?via%3Dihub>>

Acesso em: 15 jun. 2017.

KAMIYAMA, N. *et al.* Ribavirin inhibits zika vírus (ZIKV) replication *in vitro* and supresses viremia in ZIKV infected STAT1-deficient mice. **Antiviral Res.**, v. 146, p. 1-11, Oct. 2017. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354217301973?via%3Dihub>> Acesso em 23 nov. 2017

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A.J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13ª edição. Porto Alegre : AMGH editora, 2017, acesso em: 3 dez. 2017.

LANDRY, M. L.; GEORGE, K. Laboratory diagnosis of Zika vírus infection. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.141, n. 1, p. 60-67, Jan. 2017. Disponível em: <
http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2016-0406-SA?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&rfr_id=ori:rid:crossref.org&code=coap-site>
 Acesso em: 27 set. 2017

LAZEAR, H. M.; STRINGER, E. M.; SILVA, A. M. The emerging zika virus epidemic in the americas research priorities. **JAMA**, v. 315, p. 1945-1946, Mar. 2016. Disponível em: <
<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2502313>> Acesso: 16 jun. 2017.

MAY, M.; RELICH, R. F. A comprehensive systems biology approach to studying Zika virus. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v.11, n. 9, p. 1-15, Sept. 2016. Disponível em: <
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161355>>
 Acesso: 23 set. 2017

MCLEAN, E. *et al.* Computational identification of mutually homologous Zika virus miRNAs that target microcephaly genes. **Libyan J. Med.**, v. 12, n.1, p. 1-7, 2017. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5418939/>>
 Acesso em:

MEHRJARDI, M. Z. Neuroimaging findings of Zika vírus infection: emphasis of the emerging global threats. **Jpn. J. Radiology**, v. 35, n. 2, p. 87-88, Apr. 2017.

Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11604-016-0605-8>>

Acesso: 4 set. 2017

MLERA, L.; MELIK, W.; BLOOM, M. E. The role of viral persistence in flavivirus biology. **Pathog. Dis.**, v.71, n. 2, p. 137-163, July 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4154581/>> Acesso em: 30 out. 2017.

MONITORAMENTO integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a semana epidemiológica 18/2017. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde: Ministério da Saúde, v. 48, n.17, p. 1-9, 2017. Disponível em:

< <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/01/BE-2017-015-Monitoramento-integrado-de-alteracoes-no-crescimento-e-desenvolvimento.pdf>> Acesso em: 16 ago. 2017.

MOTA, M. T. O. *et al.* Mosquito-transmitted viruses : the great brazilian challenge. **Braz. J. Microbiol.** , São Paulo, v.47, p. 38-50, Dec. 2017. Suplemento, n. 1. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822016000500038> Acesso em: 4 ago. 2017.

MUNJAL, A. *et al.* Advances in developing therapies to combact Zika virus: current knowledge and future perspectives. **Front. Microbiol.**, v. 8, n. 1469, p. 1-19, Aug. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5541032/>> Acesso em: 18 nov. 2017

PANIZ-MONDOLFI, A. E. *et al.* ChikDenMaZika syndrome: the challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, London, v. 15, n. 42, p. 1-4, July 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4957883/>> Acesso em: 19 de set. 2017.

PASCOALINO, B. S. *et al.* Zika antiviral chemotherapy: identification of drugs and promising starting points for drugs discovery from a FDA-approved library. **F1000 Res.**, v. 5, n. 2523, Oct. 2016. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5112578/>> Acesso em: 19 nov. 2017.

POSSAS, C. *et al.* Zika puzzled in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 5, p. 319-327, maio 2017. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762017000500319> Acesso em: 4 ago. 2017

RIBEIRO, G. S.; KITRON, U. Zikaviruspandemic: a human and public health crisis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 49, n. 1, p. 1-3, Feb. 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822016000100001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 Aug. 2017.

ROY, A. *et al.* Solution conformation of Zika NS2B-NS3-pro and its inhibition by nature products edible plants. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v.12, n.7, p. 1-22, July 2017. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0180632>> Acesso em: 5 de nov. 2017.

SACRAMENTO, C. Q. *et al.* The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika vírus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 40920, p. 1-11, Jan. 2017. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28098253>> Acesso em: 14 nov. 2017.

SELISKO, B. *et al.* Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. **Curr. Opin. Virol.**, p. 74-83, Dec. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4295515/>> Acesso em: 30 ago. 2017.

SHIRYAEV, S. A. *et al.* Repurposing of anti-malaria drug chloroquine for Zika vírus treatment and prophylaxis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 15771, p. 1-9, Nov. 2017. Disponível em:<https://www.nature.com/articles/s41598-017-15467-6> > Acesso em: 23 ago. 2017.

SILVA, S. R.; GAO, S. J. Zika Virus: an update on epidemiology, pathology, molecular biology, and animal model. **J. Med. Virol.**, v. 88, n. 8, p. 1291-1296, Aug. 2016. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.24563/abstract;jsessionid=0367664250BC29877C6CC094863593BF.f03t03>> Acesso em: 5 set. 2017.

SONG, Byung-Hak *et al.* Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **J. Neuroimmunol.**, v. 308, p. 50-64, July 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572816304830>> Acesso em: 2 set 2017.

SUN, G. *et al.* Comprehensive annotation of mature peptides and genotypes for Zika virus. **PLOS ONE**, San Francisco, CA, v. 12, n.1, p. 1-9, Jan. 2017. Disponível: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170462>> Acesso em: 3 out. 2017.

VAN HEMERT, F.; BERKHOUT, Ben. Nucleotide composition of the Zika virus RNA genome and its codon usage. **Virology Journal**, [London], v. 13, n. 95, p. 1-9, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12975-016-0483-0>> Acesso em: 2 set 2017.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4898363/>> Acesso em: 4 set. 2017.

YANG, Y. *et al.* Development of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction-based assay for broad coverage detection of African and Asian vírus lineages. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 3, p. 199-206, June 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12250-017-3958-y> > Acesso em: 8 out. 2017.

YUAN, S. *et al.* Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika vírus NS2B - NS3 inhibitors that potently inhibit Zika vírus infection in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 145, p. 33-43, Sept. 2017. Disponível: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354217301754?via%3Dihub>> Acesso em: 18 nov. 2017.

YUN, Sang-Im; LEE, Young-Min. Zika vírus: an emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, v.55, n.3, p. 204-219, Mar. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-017-7063-6>> Acesso em: 6 ago. 2017

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drugs repurposing screens and synergetic drugs-combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, July 2017. Disponível: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13895/full>> Acesso em: 14 nov. 2017.

ZORZETTO, Ricardo. Zika: o vírus que pegou o país de surpresa. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 239, jan. 2016. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/01/12/zika-o-virus-que-pegou-o-pais-de-surpresa/>> Acesso em: 19 ago. 2017.