

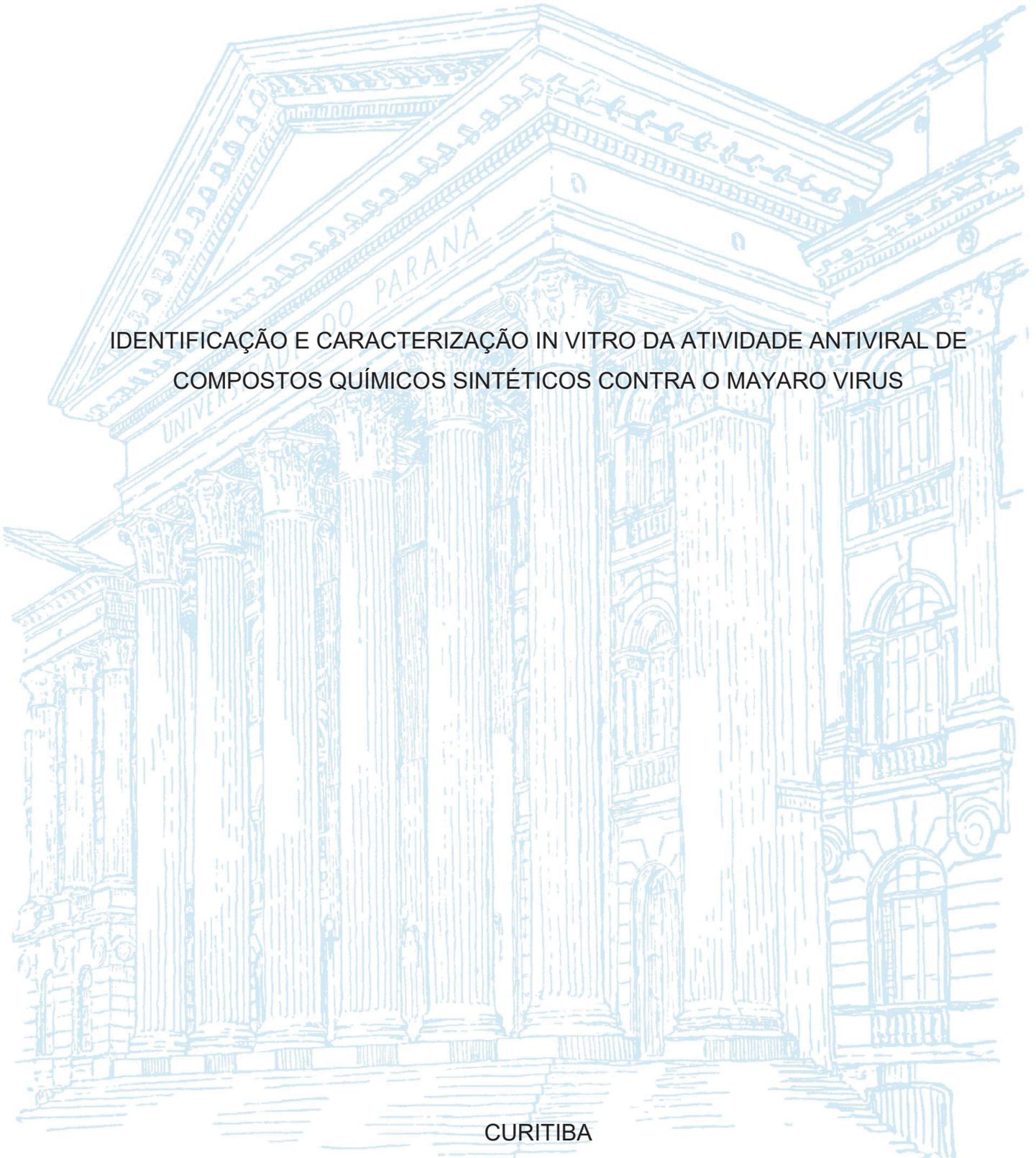
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA ANDREOLLA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE  
COMPOSTOS QUÍMICOS SINTÉTICOS CONTRA O MAYARO VIRUS

CURITIBA

2022



ANA PAULA ANDREOLLA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIVIRAL DE COMPOSTOS QUÍMICOS SINTÉTICOS CONTRA O MAYARO  
VIRUS

Tese apresentada ao curso de Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos  
Coorientador: Dr. Juliano Bordignon

CURITIBA  
2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Andreolla, Ana Paula

Identificação e caracterização *in vitro* da atividade antiviral de compostos químicos sintéticos contra o Mayaro virus / Ana Paula Andreolla. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos.

Coorientador: Dr. Juliano Bordignon.

1. Arbovirose. 2. Agentes antivirais. 3. Infecções por Alphavirus. I. Santos, Claudia Nunes Duarte dos. II. Bordignon, Juliano. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA PAULA ANDREOLLA** intitulada: **Identificação e caracterização in vitro da atividade antiviral de compostos químicos sintéticos contra Mayaro vírus**, sob orientação da Profa. Dra. CLAUDIA NUNES DUARTE DOS SANTOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

23/09/2022 08:57:14.0

CLAUDIA NUNES DUARTE DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

21/09/2022 18:11:51.0

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/10/2022 19:04:40.0

LUIZ FELIPE CARON

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ )

Assinatura Eletrônica

26/09/2022 16:33:09.0

AGUINALDO PINTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

23/09/2022 14:23:01.0

ALESSANDRA ABEL BORGES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS)

## Agradecimentos

Acredito que deixar registrado algo tão pessoal para mim em algo que fica divulgado ao mundo, numa folha de papel, muitas vezes não chega aos seus destinatários. Esse tópico da minha tese, antes de ser colocado no papel e depois da defesa será muitas vezes lembrado e falado para as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Passamos por várias conturbações durante esses quatro anos de doutorado. Uma pandemia devastadora na maior parte das famílias, o isolamento social que desencadeou vários problemas psicológicos e de saúde, a aflição de quando tudo iria acabar.

Então meu primeiro agradecimento é para Deus, que me proporcionou estar aqui, superar tudo o que aconteceu e seguir em frente com saúde.

À minha família, meu porto seguro. Minha mãe, meu pai, meu marido, meu irmão, minha cunhada e o meu sobrinho, que a cada sorriso e abraço fizeram ficar um pouco mais fácil o dia-a-dia.

Às minhas amigas, em especial a Maria Luísa e Alessandra que foram as minha confidentes e apoio quando tudo o que eu mais queria era desistir de tudo. Não posso deixar de fora a Stefanny, Luana e Thais, que sempre trouxeram luz quando só via trevas.

A todos os colegas de laboratório, que, o pouquinho que faziam todos os dias, cuidando do laboratório, organizando e até mesmo aquelas conversas engraçadas, deixavam tudo mais fácil e leve.

E não menos importante, os meus orientadores, dos quais tenho tanto orgulho de falar: Eu sou orientada da Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos e co-orientada pelo Dr. Juliano Bordignon. Eles sem dúvidas foram os responsáveis por transformar minha carreira e minha vida.

Realmente, só tenho a agradecer a todos que fizeram parte dessa minha trajetória na ciência.

Muito obrigada a todos.

## Epígrafe

*"Quem você é, o que pensa, sente e faz, o que ama... É a soma daquilo em que você se concentra."*

Cal Newport

## RESUMO

Arbovírus são vírus transmitidos a hospedeiros vertebrados por artrópodes e fazem parte de várias famílias de vírus, como *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Peribunyaviridae*. No Brasil, as arboviroses são consideradas um problema de saúde pública e a co-circulação do vírus Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Febre Amarela (YFV) e Chikungunya (CHIKV) vem mobilizando autoridades sanitárias devido à alta morbidade e mortalidade associada a estas infecções. No entanto, existe outro arbovírus negligenciado, como o vírus Mayaro (MAYV), que também está presente neste contexto epidemiológico e causa síndromes graves. Os surtos de MAYV estão geralmente localizados nos estados do norte e centro-oeste do Brasil, no entanto, nos últimos anos vêm sendo detectados em outras regiões do país. As medidas de vigilância epidemiológica ainda são incipientes e não há abordagens profiláticas efetivas e nem tratamentos com drogas antivirais para este arbovírus negligenciado. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antiviral de compostos sintéticos contra infecções pelo MAYV usando para análise um sistema de microscopia de imunofluorescência de alto rendimento (do inglês *Image High-Throughput Screening, iHTS*). Foram avaliadas duas bibliotecas de compostos: 1) biblioteca comercial aprovada pela FDA (Torciscreeen; n=52); e 2) biblioteca de compostos do Laboratório de Virologia Molecular com 52 compostos (naringenina e derivados n=21; crisina e derivados n=9; carbamatos n=22). Em uma primeira abordagem, a triagem de compostos com atividade antiviral foi padronizada e validada por *iHTS*. Em uma etapa posterior, os compostos que apresentaram a melhor atividade e menor toxicidade foram selecionados para testes adicionais, como: 1) ensaios de citotoxicidade *in vitro* e apoptose; 2) curvas de dose-resposta (cálculo de  $CC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e IS); 3) estratégia de tempo de exposição; 4) confirmação da atividade antiviral em diferentes linhagens celulares e genótipos virais. O ensaio de *iHTS* apresentou os melhores resultados (*Z score*) quando realizado com os parâmetros de  $2 \times 10^4$  células Huh7.5/poço, MOI de 0,5 por 24 horas, resultando na média de infecção de  $33,7\% \pm 6,3$  com valor de confiabilidade estatística representada pelo *Z score* de 0,9044. Assim, iniciamos a triagem de 104 compostos divididos em flavonóides (flavona e flavonona), carbamatos e os aprovados pela FDA. Destes, 7 compostos (naringenina, LLA5A, LLA5B, LLA9A, crisina, éster C6 e PPC105) em diferentes concentrações apresentaram os critérios mínimos de seleção (80% de redução da infecção e 80% de viabilidade celular por quantificação nuclear). A curva dose-resposta foi determinada e 4 compostos candidatos foram selecionados para atividade anti-MAYV por apresentarem os maiores índices de seletividade (IS). A dose máxima não tóxica (DMNT) de cada composto foi determinada segundo dados de dois ensaios: *iHTS* e citometria de fluxo. Com isso, para naringenina, LLA9A, crisina e éster C6 as concentrações de 200, 50, 25 e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente, foram determinadas como DMNT. Em seguida, realizamos a investigação dos possíveis mecanismos de ação de cada um dos compostos, através do ensaio virucida, adsorção e internalização viral e tempo de adição. Os três primeiros ensaios indicaram que a atividade antiviral dos compostos ocorre durante as etapas iniciais do ciclo de infecção do MAYV nas células. Como resultados, os tratamentos pós infecção diminuíram significativamente a porcentagem de infecção e títulos de partícula virais infecciosas, indicando que a ação provável ocorra em etapas da replicação viral. Os dados foram confirmados usando outras linhagens celulares, bem como, cepas de MAYV de outro genótipo. Nossos estudos abrem uma nova perspectiva para a inibição da infecção pelo MAYV com a identificação de compostos com atividade e deverão ser estendidos para avaliação em modelos *in vivo*.

Palavras-chave: arboviroses, alfavírus, Mayaro virus, antivirais.

## ABSTRACT

Arboviruses are viruses transmitted to vertebrate hosts by arthropods and are part of several virus families, such as *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Peribunyaviridae*. In Brazil, arboviruses are considered a public health problem, and the co-circulation of Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Yellow Fever (YFV) and Chikungunya (CHIKV) viruses has been mobilizing health authorities due to high morbidity and mortality associated with these infections. However, there is another neglected arbovirus, such as the Mayaro virus (MAYV), which is also present in this epidemiological context, and causes severe syndromes. MAYV outbreaks are generally located in the northern and central-western states of Brazil, however, in recent years they have been detected in other regions of the country. Epidemiological surveillance measures are still incipient and there are no effective prophylactic approaches or treatments with antiviral drugs for this neglected arbovirus. Thus, the aim of this study is to evaluate the antiviral activity of synthetic compounds against MAYV infections using an image High-Throughput Screening (iHTS) system for analysis. Two libraries of compounds will be evaluated: 1) FDA-approved commercial library (Torciscreeen); and 2) library of compounds from the Laboratory of Molecular Virology with 52 compounds. In a first approach, the screening of compounds with antiviral activity was standardized and validated by iHTS. In a later step, the compounds that showed the best activity and the lowest toxicity were selected for additional tests, such as: 1) in vitro cytotoxicity and apoptosis assays; 2) dose-response curves (calculation of CC50, IC50 and IS); 3) exposure time strategy; 4) confirmation of antiviral activity in different cell lines and viral genotypes. The iHTS assay showed the best results (Z score) when performed with the parameters of  $2 \times 10^4$  Huh7.5 cells/well, MOI of 0.5 for 24 hours, resulting in an average infection of  $33.7\% \pm 6.3$  with a statistical reliability value represented by the Z score of 0.9044. Thus, we started the screening of 104 compounds divided into flavonoids (flavone and flavonone), carbamates and those approved by the FDA. Of these, 7 compounds (naringenin, LLA5A, LLA5B, LLA9A, chrysin, C6 ester and PPC105) at different concentrations presented the minimum selection criteria (80% reduction in infection and 80% cell viability by nuclear quantification). The dose-response curve was determined and 4 candidate compounds were selected for anti-MAYV activity because they had the highest selectivity indices (SI). The maximum non-toxic dose (DMNT) of each compound was determined according to data from two assays: iHTS and flow cytometry. Thus, for naringenin, LLA9A, chrysin and C6 ester concentrations of 200, 50, 25 and 25  $\mu\text{M}$ , respectively, were determined as DMNT. Then, we carried out the investigation of the possible mechanisms of action of each of the compounds, through the virucidal assay, viral adsorption and internalization, and addition time. The first three assays indicated that the antiviral activity of the compounds occurs during the initial stages of the MAYV infection cycle in cells. As a result, pre-treatments and post-infection treatments significantly decreased the percentage of infection and infectious viral particle titers, indicating that the action likely occurs at later stages of the viral cycle such as viral replication and/or assembly. Data were confirmed using other cell lines as well as MAYV strains from another genotype. Our studies open a new perspective for the inhibition of MAYV infection with the identification of compounds with activity and should be extended for evaluation in in vivo models.

Keywords: arboviroses, alphavirus, Mayaro virus, antiviral.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Metodologias de infecção de Huh-7.5 com MAYV para triagem de compostos em <i>iHTS</i> .....	<b>48</b>
<b>Figura 2:</b> Metodologia utilizada no ensaio de tempo de adição dos compostos <i>hit</i> anti-MAYV. ....	<b>52</b>
<b>Figura 3:</b> Amplificações da RT-PCR para validação dos estoques virais de MAYV genótipo D. ....	<b>55</b>
<b>Figura 4:</b> Permissividade celular de diferentes linhagens celulares para o MAYV genótipo D. ....	<b>57</b>
<b>Figura 5:</b> Padronização da infecção de Huh-7.5 com MAYV genótipo D para ensaio de triagem por <i>iHTS</i> . ....	<b>59</b>
<b>Figura 6:</b> Determinação da concentração de uso dos controles de atividade anti-MAYV.....	<b>60</b>
<b>Figura 7:</b> Metodologias de infecção de Huh-7.5 com MAYV genótipo D para triagem de compostos em sistema <i>iHTS</i> .....	<b>62</b>
<b>Figura 8:</b> Padronização da infecção de Huh-7.5 com MAYV genótipo D para citometria de fluxo. ....	<b>63</b>
<b>Figura 9:</b> Triagem dos compostos com atividade anti-MAYV.....	<b>65</b>
<b>Figura 10:</b> Determinação da dose máxima não tóxica (DMNT) dos compostos candidatos anti-MAYV. ....	<b>68</b>
<b>Figura 11:</b> Ensaio virucida dos compostos candidatos anti-MAYV.....	<b>70</b>
<b>Figura 12:</b> Ensaio de tempo de adição dos candidatos anti-MAYV.....	<b>72</b>
<b>Figura 13:</b> Ensaio de adsorção e de internalização viral dos compostos candidatos anti-MAYV.....	<b>74</b>
<b>Figura 14:</b> Teste de eficácia antiviral dos compostos candidatos anti-MAYV em infecção estabelecida.....	<b>76</b>
<b>Figura 15:</b> Teste de eficácia antiviral dos compostos candidatos anti-MAYV em célula de epitélio pulmonar humano (A549) e neuronal (SH-SY5Y).....	<b>77</b>
<b>Figura 16:</b> Teste de eficácia antiviral dos compostos candidatos anti-MAYV em diferentes cepas de MAYV.....	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Linhagens celulares utilizadas durante os experimentos e suas condições para cultivo.....	<b>43</b>
<b>Tabela 2:</b> Lista de iniciadores e ciclagem utilizada para validação dos estoques virais por RT-PCR. ....	<b>45</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: teste de análise de variância;

CC<sub>50</sub>: Concentração Citotóxica para 50% das células;

cDNA: DNA complementar;

CHIKV: Chikungunya vírus;

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono;

DENV: vírus da Dengue;

D-MEM/F-12: meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco/mistura nutriente F12;

DMSO: dimetilsulfóxido;

DMNT: dose máxima não toxica;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole;

FDA: agência federal de administração de alimentos e remédios dos Estados Unidos, do inglês, *Food and Drug Administration*;

IC<sub>50</sub>: Concentração Inibitória para 50% da infecção, do inglês, *half maximal inhibitory concentration*;

IFI: ensaio de imunofluorescência indireta;

IFN- $\alpha$  2A: interferon alfa 2A;

*iHTS*: sistema de microscopia de imunofluorescência de alto rendimento por imagem, do inglês *Image High-Throughput Screening*;

IMN: intensidade média do controle não tratado;

IMV: valor da intensidade média da marcação nuclear com DAPI;

IS: Índice de seletividade;

h: horas;

h.p.i: horas pós infecção;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio;

mAb 1G1: monoclonal específico para a proteína E2 do gênero alfavírus;

MAYV: Mayaro vírus;

MAYV\_D: Mayaro vírus genótipo D;

mL: mililitros;

mM: mili molar;

mm: milímetros;

MOCK: controle negativo não tratado e não infectado, ou seja, controle celular;

MOI: índice de multiplicidade de infecção;

MTT: ensaio de viabilidade celular com 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide;

NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonato de sódio;

ng/ml: nanogramas por mililitro;

nsP1-4: proteína não estrutural 1-4;

ns2 e 5: proteína não estrutural 2 e 5;

pb: pares de base;

PBS: solução salina fosfatada tamponada;

PBS-BSA1%: PBS com 1% albumina sérica bovina;

PBS-T: solução salina fosfatada tamponada com 0,05% de Tween 20;

PCR: reação em cadeia da polimerase;

pfu/ml: unidades formadoras de placa por mililitro;

pH: potencial hidrogeniônico;

RNA: ácido ribonucleico;

rpm: rotações por minuto;

RT-PCR: reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase;

SBF: soro bovino fetal;

SINV: Sindbis vírus;

UI/ml: unidade internacional por mililitros;

YFV: vírus da Febre Amarela, do inglês, *Yellow Fever Virus*;

ZIKV: Zika vírus;

µg/ml: microgramas por mililitro;

°C: graus Celsius;

µL: microlitros;

µm: micrometros;

## LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem;

>: maior que;

=: igual que;

<: menor que;

$\sigma$ : desvio padrão;

$\mu$ : média da porcentagem de infecção;

p: positivos;

n: negativos;

90': noventa minutos;

X: porcentagem de células não viáveis da condição avaliada;

c: controles;

nt: porcentagem de células não viáveis nos poços não tratados;

pt: tratados com DMSO 20%;

T: título viral calculado por mililitro;

P: quantidade de placas contadas;

l: volume do inóculo;

D: diluição onde foi realizada a quantificação das placas;

$\pm$ : valor para mais ou para menos;

\*: diferença estatística quando  $p < 0,001$  quando comparado ao controle infectado;

#: diferença estatística quando  $p < 0,05$  quando comparado ao controle infectado;

&: diferença estatística quando  $p < 0,05$  quando comparado a porcentagem das duas cepas de MAYV.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Capítulo I - Revisão Bibliográfica: "Mayaro Virus: the state-of-the-art for antiviral drug development".....	15
3. Capítulo 2 – Identificação e caracterização <i>in vitro</i> da atividade antiviral de compostos químicos sintéticos contra o Mayaro vírus.....	41
4. Objetivo.....	42
4.1. Objetivos específicos.....	42
5. Materiais e Métodos.....	43
6. Resultados.....	56
7. Discussão.....	83
8. Considerações finais.....	90
9. Referências.....	91
10. Anexo I – Lista de compostos triados derivados de naringenina, crisina, carbamatos e biblioteca FDA.....	99
11. Anexo II – Development and characterization of the first monoclonal antibodies against Oropouche Virus.....	113
12. Anexo III – Comitê de ética em pesquisa animal.....	151

## 1. INTRODUÇÃO

Arboviroses são doenças virais transmitidas por vetores artrópodes (do inglês, *arthropod borne virus*) a hospedeiros vertebrados (CALISHER; KARABATSOS, 1988; KNIPE; HOWLEY, 2013). Os arbovírus possuem ampla distribuição geográfica, predominantemente em países de clima tropical e subtropical, como o Brasil, onde são considerados um problema de saúde pública (BRASIL, 2021). A crescente preocupação em relação à infecção por essa classe de vírus se deve a alta capacidade de adaptação a novos vetores e condições do meio ambiente, alta taxa de dispersão e capacidade de causar epidemias com grande número de casos (COFFEY *et al.*, 2013).

Os arbovírus se mantêm na natureza através de um ciclo de transmissão complexo, que envolve a replicação em vetor artrópode hematófago, principalmente, mosquitos da ordem Diptera e, através da picada desses insetos durante o repasto sanguíneo, são transmitidos para hospedeiros vertebrados (CALISHER; KARABATSOS, 1988; DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; GO; BALASURIYA; LEE, 2014). Nos hospedeiros vertebrados, como por exemplo, o homem, quando sintomática, a doença manifesta-se através de um quadro febril leve, mas dependendo do patógeno envolvido e das características imunes do hospedeiro, o quadro pode evoluir, resultando em síndromes febris hemorrágicas, neurológicas ou artralgias debilitantes (CALISHER; SHOPE; WALTON, 1988; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Existem mais de 100 espécies de arbovírus que causam doenças em humanos e são classificados em cinco famílias: *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (CALISHER; KARABATSOS, 1988; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1989). As arboviroses que atualmente representam os maiores desafios à Saúde Pública no Brasil são: Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Febre Amarela (YFV) pertencentes à família *Flaviviridae* e o vírus Chikungunya (CHIKV) pertencente à família *Togaviridae* (BRASIL, 2021). ZIKV e CHIKV foram considerados arboviroses negligenciadas durante longo tempo, porém recentemente emergiram causando epidemias com quadros clínicos graves nos indivíduos infectados e sobrecarregando o sistema de saúde pública (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; ZANLUCA *et al.*, 2015). Entre os arbovírus negligenciados, o vírus Mayaro (MAYV), pertencente à família *Togaviridae*, é endêmico em algumas partes da América Central, Caribe e América do Sul (PEZZI *et al.*, 2019). O MAYV é frequentemente detectado nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil. No entanto, nos últimos anos, o MAYV vem se dispersando para regiões não endêmicas e, portanto, apresenta potencial para emergir e causar epidemias em outras áreas do país (BRUNINI *et al.*, 2017; COIMBRA *et al.*, 2007; DE PAULA SILVEIRA-

LACERDA *et al.*, 2021; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; ROMEIRO *et al.*, 2020; SAATKAMP *et al.*, 2021). Uma vez que a maior parte da população ainda não foi exposta ao MAYV e a taxa de infestação de potenciais vetores artrópodes é alta na maior parte das regiões do país, o cenário para uma epidemia em larga escala parece plausível (BRASIL, 2019, 2021; ESPOSITO; FONSECA, 2017; LORENZ; RIBEIRO; CHIARAVALLI-NETO, 2019). Vale ressaltar, no entanto, que devido à estreita relação filogenética e antigênica entre CHIKV e MAYV, estudos recentes mostraram uma proteção cruzada contra MAYV por resposta humoral induzida por uma infecção prévia por CHIKV (FUMAGALLI *et al.*, 2021; MALONIS *et al.*, 2021; WEBB *et al.*, 2019) o que poderia eventualmente ter um impacto na transmissão e patogenicidade relacionada ao MAYV.

Em geral, infecções por MAYV em humanos causam surtos focais caracterizados por doença febril inespecífica ou síndromes de artralgia (BRASIL, 1978; DA COSTA *et al.*, 2017; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; LIMA *et al.*, 2021; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Os principais sintomas variam de calafrios, febre, manifestações gastrointestinais, tontura, coceira, dor nos olhos, mialgia e artralgia, que podem durar de meses a anos, tornando a doença causada pelo MAYV ainda mais debilitante do que outras arboviroses, cujos sintomas duram aproximadamente 3 a 4 semanas (DA COSTA *et al.*, 2017; DIAGNE *et al.*, 2020). Complicações graves como miocardite, manifestações neurológicas e hemorrágicas também podem ocorrer devido à infecção pelo MAYV (ANDERSON *et al.*, 1957; BRASIL, 1978; DIAGNE *et al.*, 2020; ESPOSITO; FONSECA, 2017; MCGILL, 1995; PINHEIRO *et al.*, 1981; THEILACKER *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos demonstram o crescente número de casos confirmados de MAYV em regiões endêmicas e não endêmicas, tanto no Brasil (BRASIL, 2021; CASSEB *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2021; SAATKAMP *et al.*, 2021; UFRJ, 2019) como nas Américas (AGUILAR-LUIS *et al.*, 2021; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; LEDNICKY *et al.*, 2016; LLAGONNE-BARETS *et al.*, 2016; MUTRICY *et al.*, 2022) e casos humanos importados em outros continentes, como na Europa (DIAGNE *et al.*, 2020; LLAGONNE-BARETS *et al.*, 2016; PEZZI *et al.*, 2019; SLEGERS *et al.*, 2014; THEILACKER *et al.*, 2013). No entanto, devido às manifestações clínicas muitas vezes indiferenciadas das outras arboviroses, como DENV, há subnotificação de casos de MAYV, como demonstrado em estudos retrospectivos de surtos, principalmente de arboviroses pertencentes à família *Flaviviridae* (AGUILAR-LUIS *et al.*, 2021; DA SILVA PESSOA VIEIRA *et al.*, 2015; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; ROMEIRO *et al.*, 2020). Além da subnotificação de casos, vários vetores urbanos potencialmente competentes para transmitir o MAYV, como o *Aedes aegypti* apontado experimentalmente, contribuem para a disseminação viral e infecção

humana (PEREIRA *et al.*, 2020). A partir desses dados, fica evidente a prevalência e dispersão do MAYV em diferentes regiões nos últimos anos, bem como sua implicação em infecções humanas em áreas urbanas, demonstrando seu potencial epidêmico (PAHO; WHO, 2019; ROMEIRO *et al.*, 2020).

No caso de eventuais epidemias causadas pelo MAYV, não há diagnóstico diferencial, profilaxia ou estratégias antivirais, já que não existem vacinas ou compostos antivirais eficientes aprovados para a prevenção e/ou tratamento da doença (MELLO *et al.*, 2020). A abordagem clínica com anti-inflamatórios, antitérmicos e analgésicos costuma ser utilizada no tratamento de sintomas secundários e, em áreas de risco, é implantado o controle de vetores artrópodes (LIMA-CAMARA, 2016). Neste contexto, a identificação de substâncias/moléculas especificamente direcionadas às infecções por MAYV se constituem uma prioridade.

Este estudo se divide em 2 capítulos abordando uma revisão bibliográfica geral sobre antivirais contra MAYV, nossos estudos com os compostos que apresentaram atividade anti-MAYV além de um anexo contendo os nossos resultados sobre o desenvolvimento de reagentes para detecção e pesquisa de vírus emergentes, como o vírus Oropouche (OROV).

Desta forma, como capítulo introdutório e revisão bibliográfica sobre o tema central da tese, apresentamos um artigo de revisão sobre os avanços mais recentes ao entendimento do ciclo replicativo do MAYV além dos compostos com atividade anti-MAYV descritos na literatura. Assim, detalhamos a estrutura e o ciclo de replicação do MAYV adicionando os possíveis mecanismos de ação dos compostos citados na revisão. Cabe salientar que o artigo “*Mayaro Virus: the state-of-the-art for antiviral drug development*” (Mayaro vírus – o estado da arte do desenvolvimento de compostos antivirais) escrito por Ana Paula Andreolla, Alessandra Abel Borges, Juliano Bordignon e Claudia Nunes Duarte dos Santos e está publicado na revista *Viruses* edição especial “*Chikungunya Virus and Emerging Alphaviruses*”.

## 2. CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Artigo de revisão*

Viruses 2022, 14, 1787. <https://doi.org/10.3390/v14081787>

### **Mayaro Virus: the state-of-the-art for antiviral drug development**

**Mayaro virus: o estado da arte para o desenvolvimento de compostos antivirais**

**Ana Paula Andreolla<sup>1,2</sup>, Alessandra Abel Borges<sup>3</sup>, Juliano Bordignon<sup>1#\*</sup> and Claudia Nunes Duarte dos Santos<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz, Curitiba, 81350-010, Paraná, Brazil;

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 81530-900, Paraná, Brazil;

<sup>3</sup> Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 57072-900, Alagoas, Brazil;

# Current address: Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial de Curitiba, Curitiba, Paraná, Brazil.

\* Corresponding authors: Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial de Curitiba, Curitiba, Paraná, Brazil.

E-mail addresses: [juliano.bordignon@fiocruz.br](mailto:juliano.bordignon@fiocruz.br) (JB) and [claudia.dossantos@fiocruz.br](mailto:claudia.dossantos@fiocruz.br) (CNDS).

Review

# Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development

 Ana Paula Andreolla <sup>1,2</sup> , Alessandra Abel Borges <sup>3</sup>, Juliano Bordignon <sup>1,\*†</sup> and Cláudia Nunes Duarte dos Santos <sup>1,\*</sup>
<sup>1</sup> Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz, Curitiba 81350-010, PR, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81530-900, PR, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió 57072-900, AL, Brazil

\* Correspondence: juliano.bordignon@fiocruz.br (J.B.); claudia.dossantos@fiocruz.br (C.N.D.d.S.)

† Current address: Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial de Curitiba, Curitiba 81310-020, PR, Brazil.

**Abstract:** Mayaro virus is an emerging arbovirus that causes nonspecific febrile illness or arthralgia syndromes similar to the Chikungunya virus, a virus closely related from the *Togaviridae* family. MAYV outbreaks occur more frequently in the northern and central-western states of Brazil; however, in recent years, virus circulation has been spreading to other regions. Due to the undifferentiated initial clinical symptoms between MAYV and other endemic pathogenic arboviruses with geographic overlapping, identification of patients infected by MAYV might be underreported. Additionally, the lack of specific prophylactic approaches or antiviral drugs limits the pharmacological management of patients to treat symptoms like pain and inflammation, as is the case with most pathogenic alphaviruses. In this context, this review aims to present the state-of-the-art regarding the screening and development of compounds/molecules which may present anti-MAYV activity and infection inhibition.

**Keywords:** arbovirus; arthritogenic alphavirus; Mayaro virus; antivirals



**Citation:** Andreolla, A.P.; Borges, A.A.; Bordignon, J.; Duarte dos Santos, C.N. Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. *Viruses* **2022**, *14*, 1787. <https://doi.org/10.3390/v14081787>

Academic Editors: Rafael Freitas de Oliveira Franca and Sergio de Paula

Received: 3 August 2022

Accepted: 11 August 2022

Published: 16 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Arboviruses are viral diseases transmitted by arthropod vectors (arthropod-borne virus) to vertebrate hosts during blood feeding [1,2]. Arboviruses have a wide geographic distribution, predominantly in countries with tropical and subtropical climates, such as Brazil [3]. This class of viruses is leading to a growing concern of viral dispersion and new transmission cycles due to its ability to adapt to new vectors and environmental conditions [4].

There are more than 100 species of arboviruses that cause disease in humans, classified into five families: *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, and *Togaviridae* [1,5]. The arboviruses that currently pose the major threats to public health in Brazil are Dengue (DENV), Zika (ZIKV), and Yellow Fever (YFV) of the family *Flaviviridae*, and the Chikungunya virus (CHIKV) of the family *Togaviridae* [3]. ZIKV and CHIKV were considered neglected arboviruses until the recent reemergence of both, leading to explosive epidemics and causing severe clinical symptoms [6,7]. Additionally, among neglected arboviruses, the Mayaro virus (MAYV), is endemic in some regions of Central America, the Caribbean, and South America [8]. Although MAYV is frequently detected in the northern and central-western regions of Brazil, it has been spreading to non-endemic regions in recent years, posing a risk of causing epidemics in large areas of the country [9–14]. Because most of the populations in these areas are immunologically naïve to MAYV, and considering the high potential rate of vector infestation, the scenario for large-scale epidemics seems plausible [3,15–17]. It is worth noting that some degree of cross-protection against MAYV by humoral response induced by a previous CHIKV infection has been observed due to the close phylogenetic and antigenic relationships between CHIKV and MAYV [18–20].

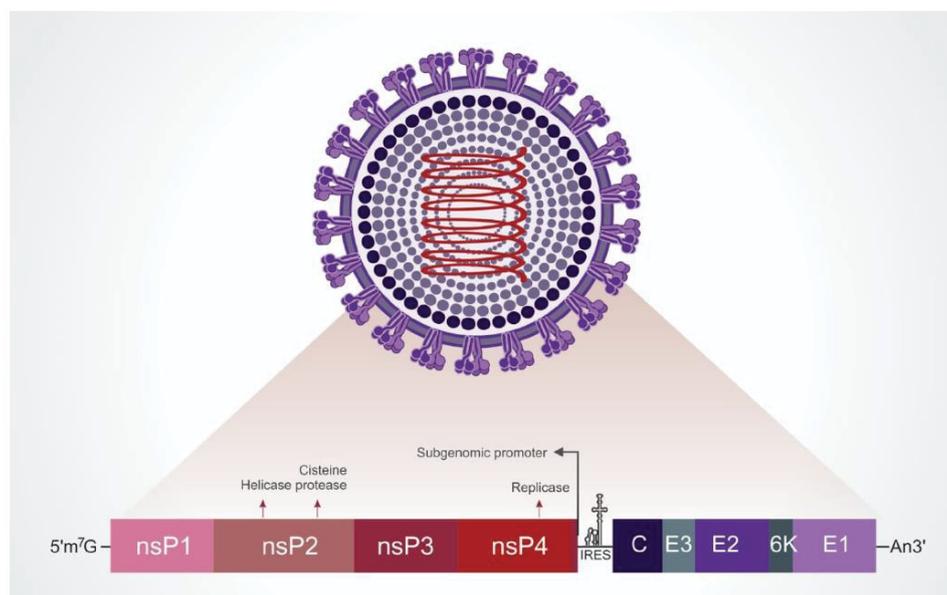
In general, MAYV infections in humans cause focal outbreaks characterized by non-specific febrile illness or arthralgia syndromes [9,21–25]. The main symptoms include chills, fever, gastrointestinal manifestations, dizziness, itching, eye pain, myalgia, and arthralgia; they can last for months to years, thus making MAYV more debilitating than that caused by other arboviruses, whose symptoms might last approximately three to four weeks [23,26]. Severe complications like myocarditis and neurological and hemorrhagic manifestations can also occur due to MAYV infection [15,24–29].

Epidemiological studies demonstrate a growing number of confirmed cases of MAYV in endemic and non-endemic regions, both in Brazil and the Americas, and the occurrence of imported human cases in other continents like Europe [8,21–23,26,30–34]. However, due to clinical manifestations often confused with other arboviruses, such as DENV, there is a large number of underreported MAYV cases, as shown by retrospective studies, especially during other arboviruses epidemics [9,11,32,35]. Several urban vectors potentially able to transmit MAYV, like *Aedes aegypti*, might also contribute to viral spread and human infection [36]. Recent surveillance studies have demonstrated the circulation and dispersion of MAYV to previously unreported areas, as well as the detection of human infections in urban settings, evidencing the potential risk of epidemics [11,37]. If epidemics caused by MAYV eventually occur, there are no vaccines or other prophylactic methods or effective antivirals approved for human use to prevent or treat the disease [38]. The clinical approach with anti-inflammatory drugs, antipyretics, and analgesics is usually used to treat secondary symptoms, and, in risk areas, arthropod vector control is implemented [39]. Thus, there is an urgent need to search for new substances/molecules that specifically target MAYV infections.

## 2. Viral Structure and Replication Cycle

### 2.1. Viral Particle

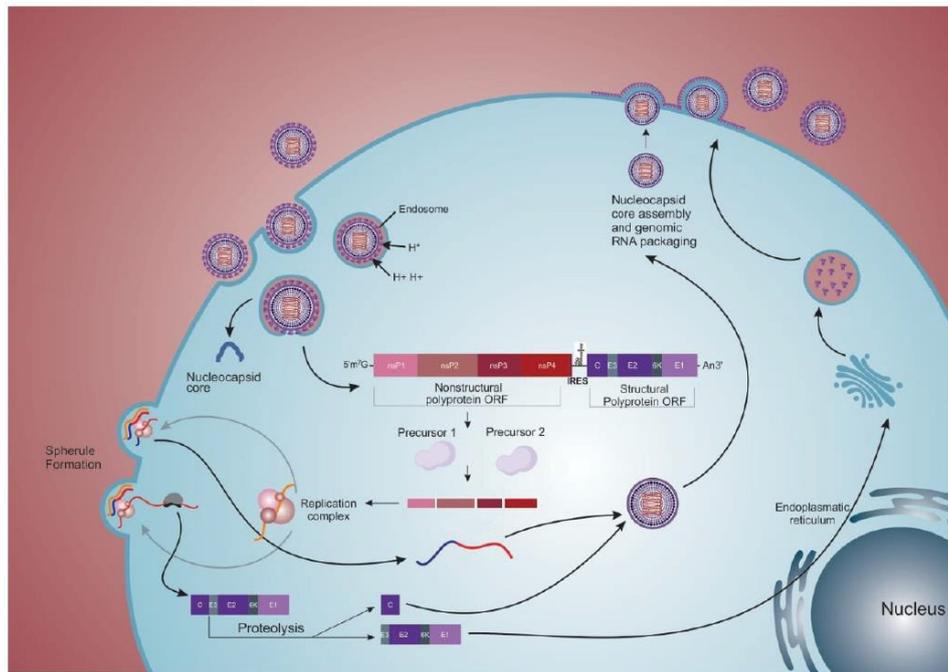
Mayaro virus (MAYV) is a member of the family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*, belonging to the Semliki forest serocomplex. The viral particle has an icosahedral capsid of about 70 nm in diameter and a lipid envelope derived from the host cell in which heterodimers of the transmembrane glycoproteins E1 and E2 are embedded [40]. The heterodimers are ordered in trimers on the virion surface [41]. The genetic material is composed of a single strand of positive-sense RNA of ~12 kb with two open reading frames (a 7 kb and a 4 kb) that each encodes a polyprotein, separated by a short non-coding sequence (Figure 1). From the cleavage of the non-structural polyprotein, the following proteins are found: nsP1, involved in mRNA capping; nsP2, with helicase/protease activities; nsP3, which has three recognized domains (the macrodomain, the alphavirus unique domain (AUD) and the hypervariable region) all of which are required for replication; nsP4, which is solely responsible for the RNA synthetic properties of the viral replicase complex because it contains the core RdRp domain and motifs. After processing of the structural polyprotein, there are associated proteins that result in the viral particle: C, capsid; E1, envelope glycoproteins of higher molecular mass 1; E2, envelope glycoproteins of higher molecular mass 2; E3, lower mass glycoprotein; 6K, protein that associates E1 and E2; TF, transframe protein involved in viral assembly/budding and also virulence factor [42] (Figure 1) [21,41,43–48]. Notably, the E3 protein is absent in the virion structure at 4.4 Å resolution from cryo-electron microscopy analysis (cryo-EM) [41].



**Figure 1.** Schematic representation of MAYV particle and genomic organization. Electron microscopy data [41] shows that the viral particle is about 70 nm in diameter, constituted of structural proteins (in purple scale: C—capsid; E1—envelope glycoproteins 1; E2—envelope glycoproteins 2; E3—envelope glycoproteins 3; 6K—protein that associates E1 and E2). In addition to these, non-structural proteins 1 to 4 (in red scale: nsP 1–4) are synthesized in the early phase of the replication process.

## 2.2. Internalization

The MAYV replication cycle and the precise function of each viral protein produced are not completely understood (Figure 2). The putative protein functions are inferred from other alphaviruses. The binding of the virions to the cell receptor is primarily mediated by the E2 protein [49]. The target cell receptors that mediate the entry of the virus are also not fully known; however, the adhesion molecule Mxra8 (also known as DICAM, ASP3, or limitrin, a member of the immunoglobulin superfamily) was recently described as a receptor for MAYV and other arthritogenic alphaviruses, like CHIKV, Ross River, O'nyong nyong, and Barmah Forest virus [46,50]. However, for encephalitic alphaviruses, such as VEEV and EEV, this receptor, when blocked, does not seem to affect the infection [50]. The uptake of the viral particle is closely linked to the lipid rafts of cell membranes, where cholesterol is the main component [49]. Endocytosis occurs dependent and/or independent of clathrin (caveolar via), the former pathway most frequently used by MAYV [49]. Once endocytosed, the clathrin layer (when present) is quickly removed from the vesicle, and the virus is delivered to the initial compartment of the endosome. The presence of ATP-dependent proton pumps is the critical characteristic of the endosome, which causes acidification of the vesicle during the maturation stages. This pH change is fundamental to viral RNA delivery to the cell cytoplasm, as it will be the initial event of intermembrane fusion (vesicle and viral envelope) [49,51].



**Figure 2.** The replicative cycle of MAYV. Cell entry of MAYV is mediated by endocytosis and occurs via a clathrin-coated vesicle or, alternatively, caveolin. Internalization begins by binding the E2 virus with host cell receptors, possibly Mxra8. After endosome formation, acidification of its interior occurs, leading to structural changes in the viral envelope, exposing the E1 protein and promoting cell membrane and virus fusion. As a result, the nucleocapsid and viral genome are released into the cell's cytoplasm. The genome is recognized by ribosomes, and a pair of nsP precursors is synthesized from the generated viral mRNA. The replication complex (RC) produced from the interaction of nsP is among the precursors. The RC catalyzes the synthesis of a negative-strand RNA that will, in turn, be the template for generating genomic (49S) and subgenomic (26S) RNA. The 26S structural polyprotein is generated, and the capsid protein is released and surrounds the 49S RNA through the action of the autoproteolytic serine protease, assembling the nucleocapsid. The remainder of the polyprotein is directed to the processing and maturation of E2 glycoproteins (through the E2 precursor protein; pE2) and E1 glycoproteins in the endoplasmic reticulum and Golgi complex. The mature glycoproteins will associate with and be transported to the cell membrane. The presence of the nucleocapsid in the membrane allows the recruitment of E1, initiating the process of viral assembly and the release of new MAYV and other alphavirus progenies through the cell membrane.

The events of alphavirus membrane fusion are comprised of three steps: (1) dissociation of E1 from E2; (2) E1 insertion into the target membrane; and (3) the formation of E1 homotrimers [51,52]. Intermembrane fusion starts from the acidification of the endosome, which will promote the dissociation of the two envelope proteins (E1 and E2). These proteins are associated in metastable conformation in the form of heterodimers, and upon dissociation, the E1 fusion loop is exposed and inserted into the target membrane of the vesicle. In a pH-independent interaction, the stem region of the E1 complex folds, distorting the target membrane through the cooperative action of several trimers, providing

the necessary energy to mediate membrane fusion. Fusion proceeds through a hemifusion step where the two outer leaflets fuse. The final stable post-fusion E1 homotrimer is formed, located on the same side as the fusion loops, and transmembrane domains are anchored. Concomitantly, the E1 homotrimer refolds, resulting in complete fusion and thus forming the fusion pore, which will allow the exit of the viral nucleocapsid (NC) from the endosome to the cytoplasm of the cell [26,44,49,51].

### 2.3. Replication

Once the NC is in the cytoplasm of the cell, its disassembly is facilitated by interactions with free ribosomes [53–55]. Cellular ribosomes recognize the CAP region and the 5'-AUG initiator codon of the viral RNA in the cytoplasm, leading to the translation of 49S (genomic) RNA and its processing [53,54,56]. This entire process occurs within bulb-like structures present in the plasma membrane, known as spherules (Figure 2), and the structure of these membranes as a type I cytopathic vacuole (CPV-I) [57–59]. After recognition of the CAP region, the non-structural genes are recognized and translated, giving rise to polyproteins P123 (precursor of nsP1, nsP2, and nsP3) in higher amounts and P1234 (P123 and nsP4) in lower amounts. This phenomenon is due to the presence of a stop codon at the junction of nsP3 and nsP4 [60,61]. In both situations, the P123 polyprotein is processed sequentially, individualizing each protein into mature species. Through its proteolytic function, mature nsP2 will catalyze cleavages on P1234 releasing RNA-dependent RNA polymerase (nsP4), which forms the replication complex (P123+nsP4) when associated with P123 [62], involved in the synthesis of complementary negative (–) RNA (Figure 2) [62–66]. In addition, nsP2 will promote the shutdown of transcription mediated by RNA polymerase II of the host. This process was evidenced through the interaction of nsP2 with subunit A of RNA polymerase II (Rpb1) and subunit 2 of transcription initiation factor IIE (TFIIE2), suggesting a shutdown of cellular transcription [67]. In addition to the pivotal role of nsP2, the release of nsP1 is also reported as essential for creating a replication complex by associating with nsP4 (nsP1 + P23 + nsP4), which will use the (–) RNA as a template to synthesize new positive strands of genomic RNA [61,62,64]. However, the recent study by Gorchakov et al. (2008) [68] with the SINV indicated that the P123/nsP4 complex was able to synthesize (+) RNAs without the need for cleaving nsP1 from the P123 protein [69]. This process is still not fully understood with regard to MAYV. In addition to the transcription of (+) RNA, a subgenomic mRNA (26S transcript) is also transcribed, which will be translated into a structural polyprotein and give rise to structural proteins after cleavage (Figure 2) [70].

From the structural polyprotein precursor, the protein C is the first structural protein generated through its processing by the action of the autoproteolytic serine protease to encapsulate the newly synthesized RNA molecules, originating new NCs [48,51,71,72]. Concomitantly, the remaining polyprotein comprising the glycoprotein precursor (E3-E2-6k-E1) is routed to the endoplasmic reticulum (ER). The N-terminal portion of the E3 glycoprotein contains a signal peptide which interacts with the ER membrane, translocating the polyprotein to the ER lumen. Once in the ER, the host signalase recognize both the N and C-terminal portions of the 6k, creating the products E3E2, 6k, and E1, which will be anchored in the organelle membrane. Next, E3E2 and E1 associate to form dimers that move with 6K through vesicles to the plasma membrane. Finally, E3E2 is cleaved by furin proteases present in a post-Golgi compartment, generating the glycoproteins E3 and E2 (Figure 2) [40,44,71,72].

Notably, the 6k protein is palmitoylated, enabling it to anchor to the membranes. This protein is involved in the transport of E1 and E2 to the plasma membrane and is a viroporin that enhances membrane permeability in infected cells by forming ion channels [42]. The 6K protein presents two transmembrane helices, classified as a Class II subclass A of viroporin types, connected by a short cytoplasmic loop [42,73]. In addition, the 6k gene undergoes a frameshift event and starts to produce the TF protein [42]. Within the gene encoding 6K, a heptanucleotide slip site (UUUUUA) is highly conserved among the alphaviruses that causes a -1 ribosomal shift. This frameshift produces the TF protein in place of 6K and E1

with a frequency ranging from 5% to 40%, depending on the alphavirus species [74,75]. The 6K and TF proteins have an identical N-terminal portion (including the first transmembrane domain with ion channel activity) but differ in the C-terminal portion. The TF protein contains a C-terminal extension of the 6K protein and a longer cytoplasmic domain than 6K [74]. Functionally, TF seems essential for viral assembly, presenting a virulence role as antagonist of the host type I interferon responses [76].

#### 2.4. Exit

The complete intracellular cycle of viral replication takes place four hours after the virus enters the cell. Virus release occurs after the anchoring of the viral capsid in the cell membrane; the viral lipid envelope is then formed through the budding mechanism (Figure 2) [72,77,78].

NC interacts with E2 proteins, initiating the process of assembly and the budding of viral particles [79–82]. This interaction occurs in a pocket (hydrophobic on the bottom and hydrophilic on the top) in the C-terminal domain of protein C, to which the E2 protein is non-covalently linked through its C-terminal domain [41]. In this interface, a consensus motif containing threonine, proline, and tyrosine (TPY) is present, which is conserved within the genus *Alphavirus* [83]. Previous results have suggested the co-transport of C and E2 to the plasma membrane, as both proteins colocalize in mobile vesicles in the cell cytoplasm [79].

The viral envelope is enriched with cholesterol and sphingolipids precisely because, in mammals, it sprouts from host cell membrane domains rich in these components [49,84]. These sites are present both in the cell body and in intercellular extensions induced by the virus itself (a phenomenon called cell-to-cell transmission) that facilitates the infection of neighboring cells [85]. The alphavirus exit from cells is determined by host factors like actin cytoskeleton remodeling, which promotes the transport of glycoproteins to the plasma membrane. Microscopic studies have revealed actin rearrangements and the accumulation of actin clusters in the cytoplasm at the final steps of viral infection with the co-localization of E2 in these foci and along the filaments [86]. The precise mechanism(s) of cleavage of the budding particles is still undetermined. It is unknown whether only the NC's interaction with the envelope is strong enough to detach itself; nevertheless, other viral proteins, like 6K and TF, are involved in the process [42,87]. Studies with mutants in the 6K and TF proteins have shown that they play an essential role in the viral assembly and budding, although the exact mechanism is not completely understood [42]. According to Ribeiro-Filho et al. (2021) [41] the cryo-EM structure suggests that MAYV capsid assembly is based on electrostatic contacts between the C proteins. In addition, data suggest a probable action of nsP1 by inhibiting tetherin, an interferon-induced membrane protein, which has the action of restricting the exit of enveloped viruses [88–90]. Additional studies are needed to define the precise budding mechanism of alphaviruses from infected cells.

#### 2.5. “Cell-to-Cell” Transmission

Alphavirus infection induces drastic remodeling of the cell cytoskeleton. This remodeling promotes the production of two types of cell extensions, the short- and long-filopodia-like structures [85,91] with length, contacts, and components at their main differences. The short ones are from 2 to 7  $\mu\text{m}$  in length and comprise only F-actin filaments. Its induction requires the E2-C interaction [84,92] and is involved with nsP1, as assays performed using only structural proteins did not trigger such formations, and specific viral protein labeling demonstrated the co-localization of E2-C and nsP1. However, it is unclear whether nsP1 can mediate cell-to-cell transmission or act to protect viral particles from neutralizing antibodies [79,91].

The long intercellular extensions have more than 10  $\mu\text{m}$ , can reach up to 60  $\mu\text{m}$ , and are composed of F-actin and tubulin [79,91,93]. They are usually identified when there is a production of active structural proteins, with E2, E1, and C detected throughout the length of the filament. These extensions emerge from an infected cell towards to an

uninfected cell through retrograde actin transport, and during this process viral particles moved and budded from the infected cell through these extensions. The contact tip of the filopodium-like structure is usually flat and does not fuse with the other cell, hence the name “virological synapse” [94]. Interestingly, there is a loss of stress fibers in infected cells in the late periods of infection, correlating with the appearance of extensions [79,91].

The “cell-to-cell” transmission requires the budding and release of active viral particles. Thus, transmission is not mediated by viral RNA transfer, replication complexes, or type II cytopathic vacuoles (CPVIs) [86]. This is in agreement with the observed lack of cytoplasmic or membrane continuity between the infected cells and the target [93]. Intercellular transmission prevents the action of neutralizing antibodies on the virus, suggesting that nascent particles are somehow protected from the extracellular environment [85,95,96]. The data also strongly suggest that infection of target cells occurs by endocytosis and fusion triggered by low pH, as does initial infection. Furthermore, the host determinants for such a phenomenon to occur are unknown, and such structures are species and/or cell-line dependent.

### 3. Antivirals

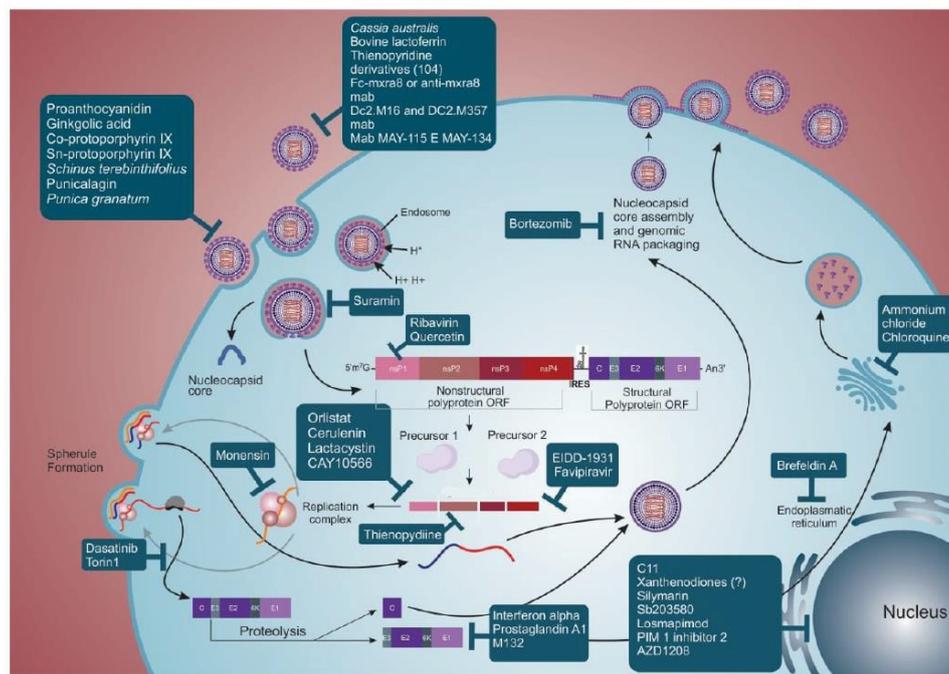
Presently, there are no specific antiviral treatments or vaccines against MAYV infections. In urban environments of endemic areas, vector control through insecticide spraying is the only available measure to prevent infection. The clinical management of infected patients is limited to drug administration such as analgesics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and antipyretics to relieve symptoms.

Several natural and synthetic compounds have been evaluated to identify those with low cytotoxicity to host cells and the compounds’ ability to inhibit viral infection [97]. The parameters most commonly used for this purpose are the cytotoxic concentration for 50% of the cells (CC50), inhibitory concentration for 50% of the infected cells (IC50), and the selectivity index (SI) [98,99]. The SI is a factor calculated using the two previous parameters (CC50 and IC50), facilitating the comparison of compounds in terms of cytotoxicity and antiviral potency [100]. Substances that present antiviral activity are able to inhibit critical steps of viral replication, like events related to virus entry into host cells, activity of enzymes involved in the replication complex (proteases, viral helicase, and RNA-dependent RNA polymerase), or in late stages during particles assembly and release to the extracellular medium [38].

In addition to substances that directly affect the activity of virus proteins or enzymes, some compounds can modulate the host response and affect virus replication. Such substances can present the advantage of broad-spectrum use against other related alphaviruses. However, these compounds must be carefully studied, as the side effects generated by their use can cause disorders compared to compounds that act directly on virus proteins or enzymes [101]. In this review, we describe the state-of-the-art on promising substances/molecules with anti-MAYV activity, which are demonstrated in Figure 3.

#### 3.1. Virucidal Compounds

Compounds or plant extracts are considered virucidal when they interact directly with the viral particle and, consequently, prevent infection onset. Several reports indicate that the flavonoid proanthocyanidin ([(-)-epicatechin-(4 $\beta$  -> 8)-(-)-4'-methylepigallocatechin]; PAC) isolated from methanol extraction of *Maytenus imbricata* (Celastraceae) roots showed a virucidal effect on MAYV. This compound acted directly in MAYV particles and not in the host cells, with an EC50 (effective concentration for 50% of infected cells) of  $37.9 \pm 2.4 \mu\text{M}$  and a SI above 43 [102]. Ginkgolic acid, a substance isolated from the *Ginkgo biloba* plant, has a similar effect on MAYV infectivity [103].



**Figure 3.** MAYV replication cycle and anti-MAYV compounds. Compounds with anti-MAYV activity are described at different time points of viral replication. Proanthocyanidin, ginkgolic acid, Co and Sn-protoporphyrin IX, schinus terebinthifolius, and punicalagin from *Punica granatum* have virucidal action. The compounds of *Cassia australis*, bovine lactoferrin, thienopyridine derivatives (no. 104), and the antibodies Fc-Mxra8 and anti-Mxra8, DC2M16 and DC2M357, MAY-115 and MAY-134 prevent adsorption of the viral particle. Suramin acts by blocking fusion during the viral internalization step. Ribavirin appears to interact with viral RNA before initiating replication, and quercetin acts to inhibit viral RNA metabolism. Some compounds interact with non-structural proteins, such as orlistat, cerulenin, CAY10566, and lactacystin that interact with nsP1; thienopyridine interacts with protease (nsP2); EIDD-1931 and favipiravir interact with nsP4. Monensin and epicatechin act during viral replication. Dasatinib and torin-1 inhibit the translation of subgenomic mRNA. M132 interferes during the synthesis of E1 and nsP1, possibly by compromising the action of lysosomal cysteine proteases. Interferon alpha inhibits the protein synthesis of envelope glycoproteins, possibly by increasing intracellular pH, compromising protein traffic. Prostaglandin A1 also interferes with the synthesis of envelope glycoproteins by acting on the synthesis of HSP70. Brefeldin A blocks the transport of envelope proteins in the endoplasmic reticulum. Ammonium chloride and chloroquine act on the Golgi complex, shifting the pH of the organelle and preventing the transport of glycoproteins to the cell membrane. Bortezomib interferes with the ubiquitination of the viral capsid, preventing the packaging of replicated viral RNA. Some compounds also target host factors like C11 (STING antagonist and IRF3 phosphorylation), xanthenediones (intracellular event not determined), silymarin (oxidative stress modulation), SB203580 and losmapimod (p38 protein suppressors), PIM1 inhibitor 2 and AZD1208 (which interferes with the negative regulation of interferon-stimulated, like PML, OASL, and TRIM5 genes).

Hydrophobic molecules like Co-protoporphyrin IX and Sn-protoporphyrin IX also have virucidal activity. By elucidating the mechanism of action of these compounds, it was found that they act on the conformation of envelope proteins, deforming the viral particle and preventing adsorption of receptors on the cell plasma membrane in an in vitro model [104].

Compounds present in the extract of *Schinus terebinthifolius* fruit, which is a condiment widely used in cooking, were evaluated against MAYV infection and proved to be virucidal in an in vitro model. Four substances (two bioflavonoids and two ethyl acetate) were isolated, and three of them had SI (60, 12, 98, 6, respectively) greater than that of ribavirin (used as antiviral control; SI = 8) [105]. The virucidal mechanism of these substances remains unknown. Another isolated compound is punicalagin from the extract of pomegranate (*Punica granatum*). Both extract and isolate proved virucidal for MAYV, with SI = 14 and 48, respectively [106]. The mechanisms of action for MAYV inhibition are still unclear. Studies using SARS-CoV2 demonstrated that its action is through the reversible and non-competitive binding to the viral surface glycoproteins [107].

### 3.2. Compounds That Interfere with Adsorption and Internalization of the Virus Particle

Some substances/molecules can prevent the anchorage, entry, and internalization of MAYV to the cell by inhibiting fundamental pathways for the initiation of viral replication. For example, it was found that extracts from *Cassia australis* leaves have an anti-MAYV effect, especially those containing condensed tannins (SI = 33; relative potency—RP = 16.5). This substance seems responsible for the antiviral activity since, characteristically, tannins have the ability to produce complex lipo and glycoproteins. The viral envelope is mostly composed of glycoproteins, so the compound possibly inhibits viral adsorption and internalization [108].

Bovine lactoferrin, a multifunctional globular protein isolated on a large scale from bovine milk and easily found commercially, acts by blocking the entry of MAYV into the host cell. The block seems to depend on the presence of sulfated glycosaminoglycans on the cell membrane surface, preventing viral anchorage [109].

Compounds already employed in the clinic for the treatment of other conditions or diseases, such as suramin, used to treat African sleeping sickness and onchocerciasis, also showed anti-MAYV efficacy. After treating cells with this drug, the inhibition of MAYV entry was evidenced, possibly because it causes conformational changes in the viral envelope proteins, impairing fusion with the host cell membrane [110]. A study analyzing the in vitro infection with CHIKV suggested that suramin interacts with the E2 protein, inhibiting the adsorption and/or conformational changes necessary for membrane fusion [111].

Another class of drugs is that based on antibodies. Only a few studies characterizing the cell receptors involved in MAYV entry into host cells are available [46,51,112–114]. As mentioned previously, it has been recently shown that the Mxra8 receptor is the putative entry molecule for MAYV and other arthritogenic alphaviruses and, thus, a potential therapeutic target. Using the Fc-Mxra8 fusion protein or anti-Mxra8 monoclonal antibody as treatment, in vitro infection by MAYV, CHIKV, Ross River virus, O'nyong nyong virus (ONNV), and Barmah Forest virus was reduced. Additionally, mice (C57BL/6) infected with CHIKV and ONNV and treated with Fc-Mxra8 fusion protein or anti-Mxra8 blocking antibodies had reduced infection and disease signals (foot swelling) [50].

Specific anti-MAYV neutralizing antibodies are also available, representing potential therapeutic targets to interfere with viral adsorption and internalization. Of the 151 hybridomas generated in the study by Earnest, J.T. et al. (2019) [115], 11 presented neutralization activity against MAYV. Neutralizing antibodies bind to E2 and E1 protein from D and L genotypes, with EC50 lower than 10 ng/mL. Additionally, the anti-MAYV neutralizing antibodies presented cross-reactivity and also inhibited the in vitro infection by other alphaviruses, like UNAV and CHIKV [115]. The neutralization of MAYV in vitro infection occurred mainly through monoclonal antibody recognition of the E2 protein, as previously demonstrated for antibodies produced against CHIKV [116] and Eastern Equine Encephalitis virus (EEEV) [117]. It was also demonstrated that an antibody cocktail that

recognizes E1 and E2 had a greater effect in in vivo infection of C57BL/6j mice [115]. There are reports of humanized monoclonal antibodies that recognize different alphaviruses, like MAYV and CHIKV. These monoclonal antibodies were developed through expression of the E3-E2-E1 protein, using a more conserved region among the arthritogenic alphaviruses. Two monoclonal antibodies, DC2.M16 and DC2.M357, were generated and recognized the B domain of the E2 protein; they promoted neutralization, possibly through phagocytosis performed by monocytes (in vitro test) [20].

### 3.3. Compounds That Interfere with Replication, Morphogenesis, and Viral Exit

There are substances/molecules with inhibitory activity beyond viral entry, affecting steps such as viral replication, translation and the processing of viral proteins, morphogenesis/maturation, and viral sprouting, which are critical events for the formation of viral progeny [26].

Belonging to the class of immunomodulatory proteins, interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) is one of the viral inhibitors more widely used as an in vitro molecule to treat MAYV infection in cell lines [118–121]. Analysis by SDS-PAGE and protein densitometry showed that the inhibition of MAYV protein synthesis is heterogeneous after treatment with IFN- $\alpha$ , acting more significantly on glycoproteins E1 (99%) and E2 (79%) and their precursors (84% and 77%, respectively) compared to protein C (28%) [120]. This phenomenon can be explained by the increase in intracellular pH caused by treatment with IFN, compromising the traffic of proteins in the endoplasmic reticulum and Golgi complex, as previously shown in in vitro infections by vesicular stomatitis virus [122], herpes simplex viruses [119], CHIKV, ZIKV, and SARS-CoV-2 [118] and in the human treatment of hepatitis B [123].

Ribavirin (RIBV), another compound used in the clinic to treat viral infections [124–128] and widely used to control MAYV infection, has well-known pharmacological properties, such as bioavailability and toxicity. The putative mechanism of action of this compound is through (1) inhibiting enzymes related to the capping reaction of the viral RNA, since it is a guanosine analog; (2) suppressing the viral RNA synthesis by inhibiting the enzyme inosine-5'-monophosphate dehydrogenase; or (3) when phosphorylated, it can directly interfere with viral RNA synthesis during transcription [126,129,130]. RIBV has already been shown to be effective against CHIKV in mouse models, mainly when associated with doxycycline [131].

Furthermore, it has been demonstrated that compounds fractionated from plant extracts also impair MAYV replication. An example is quercetin isolated from *Bauhinia longifolia* (Bong.), which has a robust anti-MAYV activity (SI = 94; relative potency = 5) compared to ribavirin (SI = 8), and is used as a control compound [132]. Although the exact mechanism of action of quercetin during MAYV infection remains unclear, it has been suggested that it may be due to inhibition of viral RNA metabolism as observed for DENV-2 [132,133].

Epicatchin extracted from *Salacia crassifolia* is another compound that showed an anti-MAYV effect (SI = 7; RP = 2). There is strong evidence of the interaction of epicatchin with some viral components, possibly blocking important stages of the replication cycle and formation of new viral progenies without interfering with host cell metabolism. However, the precise mechanism of action of the compound action remains unknown [102].

In addition to natural compounds, synthetic molecules like thienopyridine derivatives also stand out as antivirals. Candidate compound 104 (SI = 125), for example, has low toxicity risks and severely influences viral protein synthesis, probably by inhibiting nsP2 transcription. There is a deficiency mainly in the assembly of the MAYV particle, favoring the production of non-infectious particles [134]. This compound showed promising action in inhibiting MAYV replication, acting at different points in the viral cycle. This conclusion was supported because (a) the viral protein synthesis was highly impaired; and (b) transmission electron microscopy after treatment with the candidate compound indicated action on the viral envelope [134].

Additionally, drugs already employed to treat other pathologies have shown anti-MAYV activity, such as ammonium chloride and chloroquine. Their action is demonstrated

by a large amount of virus within intracytoplasmic vacuoles, in addition to free precursors and proteins (possibly capsid or nucleocapsid) in the cell cytoplasm, which are rarely seen during untreated infection. This effect possibly occurs because these substances raise the pH of the organelles of the Golgi complex, thus inhibiting the transport of glycoproteins to the membrane. In addition, this pH change can impair the function of some enzymes involved in the processing and maturation of viral glycoproteins, also affecting sprouting and viral infectivity. Consequently, these drugs seem to force the virus to follow an alternative morphogenesis route, leading to premature intracellular viral maturation [135].

The drugs EIDD-1931 and favipiravir have also been efficient in inhibiting MAYV infection. In the clinic, they are used to treat influenza A and B and resistant pandemic influenza viruses. Both drugs acted on MAYV viral replication in *in vitro* models by inhibiting polymerase and causing lethal mutagenesis during viral replication [110], similar to what has been reported for CHIKV [136,137] and Venezuelan Equine Encephalitis virus (VEEV) [138]. In a C57BL/6 mouse model, favipiravir pre-treatment reduced infection, RNA copies, and viral particle production in different tissues (e.g., brain, liver, heart, and spleen) during infection by MAYV [139], CHIKV [140] and Western equine encephalitis virus [141]. However, when the treatment of this compound is post-infection, of all tissues tested (e.g., brain, liver, heart and kidney) only the right quadriceps muscles showed a statistical decrease in MAYV infection [139]. A reduction in footpad swelling was also found in an animal model for the evaluation of arthritis and arthralgia triggered by MAYV [139]. In addition, in a retrospective study with pregnant women who used favipiravir, no major teratogenic effects were observed [142].

Inhibitors of the membrane-associated kinase family, such as Dasatinib and Torin 1, appear to act more specifically in viral translation without interfering with host mRNA translation [143,144]. It has been demonstrated that Dasatinib and Torin 1 inhibit the translation of subgenomic mRNA, resulting in a decrease in viral infection not only for MAYV but also for other alphaviruses [145].

In addition to drugs used as antivirals, some antibiotics have also been evaluated as potential anti-MAYV molecules. Monensin is an example of a natural antibiotic used as an additive in ruminant feed to increase feed efficiency. Its action, which has been previously described for other alphaviruses, such as the Semliki Forest and Sindbis viruses, has also been evaluated for MAYV. Treatment of both vertebrate and invertebrate cells with Monesin showed severe inhibition of MAYV replication, although viral morphogenesis was not affected [146].

#### 3.4. Drugs That Modulate Host Response to Viral Infection

As previously mentioned, substances that may act on specific host factors are also promising alternatives for the development of broad-spectrum antiviral drugs. Nevertheless, there are still gaps in understanding the MAYV infection cycle in the host cells that would make the development and testing of this class of compounds a challenge.

After a high-throughput screening of 52,000 compounds, a small molecule named C11 that activates the signaling of the innate immune response was identified. C11 acts as an agonist of the adaptor protein STING and activates antiviral genes through phosphorylation of IRF3, mainly inducing the IFN type I response. Since alphaviruses are sensitive to the IFN response, including MAYV, this substance decreased the viral titer in an *in vitro* model [147].

Brefeldin A, a fungal metabolite reported to block newly synthesized endoplasmic reticulum protein transport, can also inhibit MAYV replication. By analyzing its effect during infection, a drastic reduction in the synthesis of viral proteins in mammalian cells was found which may or may not affect their glycosylation [148].

Prostaglandin A1 (PGA1) is another compound that has been shown to be effective against MAYV. This widely studied compound plays a role in several physiological and pathological processes, in addition to influencing the replication of several viruses like SINV [149], vaccinia virus [150] and Sendai virus [151]. After treating Vero cells with PGA1

and challenging them with MAYV, inhibition of E1 and E2 glycoprotein synthesis was found to be associated with triggering the synthesis of 70 kDa heat shock cell protein (HSP) [152].

The cyclic ketones, which are classified into different groups based on their chemical structure, have also been evaluated for their activity against different microorganisms and diseases. Among them, the xanthenodiones stand out as anti-bactericidal, anti-leishmania, antifungal, antitumor, anti-trypanosome, and antiviral substances [153,154]. Several compounds of this group were produced from the mixture of 1,3-diketone, aldehyde, and  $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$  and evaluated during in vitro infection by MAYV [155]. Only one of them, compound 9, remained in the test, as it obtained the best SI (15.8) [156]. However, when evaluating its anti-MAYV action, it was found to be effective only in pre-treatment or in high concentrations (338.8  $\mu\text{mol/L}$ ) [156], unlike what was verified for ZIKV, in which it interacts with viral envelope proteins preventing adsorption [155]. The likely mechanism of action is unclear, and it is believed that it may act on intracellular events. This hypothesis is based on some antiviral assays where there was no virucidal action or activity in the early stages of entry, as there is no decrease in infection compared to the positive control [134,156].

Drugs that act to inhibit the synthesis of new long-chain fatty acids, like orlistat (anti-obesity FDA approved) and cerulenin (antibiotic in test phase), which impair the activity of fatty acid synthase, as well as the substance CAY10566 that acts on the activity of stearyl-CoA desaturase, have been shown to reduce in vitro MAYV replication. These enzymes seem important in the MAYV replication cycle and other arthritogenic alphaviruses, as they interfere with the plasma membrane anchoring of the nsP1 protein present in the replication complex [157]. Furthermore, cerulenin, considered an inhibitor of lipid synthesis, has been shown to reduce MAYV replication, probably preventing the incorporation of [3H] glycerol into lipids at any time after infection. Activity analysis at different time points during infection showed that the inhibition was more pronounced at the beginning of the infection, as it interferes with the synthesis of viral proteins [158].

Proteasome inhibitors are another class of virus inhibitory substances that can affect different stages of the replication cycle of CHIKV, rotavirus, and vaccinia virus [159–161]. Many viruses have evolved to hijack the proteasome machinery to make their replication more efficient, as this pathway is essential for cellular processes such as the cell cycle, immunity, and autophagy [162–164]. These drugs are described in the literature as acting at different stages of the viral replication cycle, both in protein expression [165], maturation [166] and budding [167,168]. For MAYV infection, the compounds MG132 and lactacystin have been shown to modulate the synthesis of E1 and nsP1, constituting critical steps during the replicative cycle. This drug activity reduces the amount of infectious viral particles produced in in vitro assays [77]. Another study with EEEV and VEEV compared the effectiveness of MG132 with another proteasome inhibitor, Bortezomib, which is FDA-approved to treat some forms of myeloma and lymphoma. In an in vitro model, there was a decrease in viral genomic copies, possibly due to interference by the ubiquitination of the viral capsid, preventing viral RNA from going into the cell's cytoplasm [169]. Furthermore, MG132 also showed activity in the inhibition of additional targets, like certain lysosomal cysteine proteases, calpains, and cathepsins [170].

Another example is a plant-derived compound, silymarin, obtained from *Silybum marianum*. This substance acts on MAYV replication with a SI = 29.6, but the mechanism of action remains to be elucidated. One hypothesis that explains the anti-MAYV activity of silymarin in vitro is the modulation of cellular oxidative stress triggered by viral infection, decreasing the formation of ROS and, consequently, the levels of MDA (malondialdehyde) and protein carbonyl [171]. The efficacy of silymarin was assayed in a non-lethal model of disease in BALB/C mice [172,173]. In addition to the drastic decrease of viral infection in various organs (e.g., liver, spleen, brain) and serum, there was a control of the oxidant activity caused by the virus (carbonyl protein and MDA) and an increase of antioxidants (catalase, glutathione, and SOD activity). Thus, protection of the liver (ALT and AST activity) and other organs and the controlling of pro-inflammatory factors like IFN- $\beta$ , TNF, IL-6, and

IL-1B were also observed [28,173–175]. The in vivo (mouse model) as well as in vitro cell assays findings support the hypothesis that the modulation of MAYV-induced oxidative stress increases disease severity [176].

Other cellular factors that appear to be necessary for efficient replication of MAYV, at least in a cell model, are the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [177]. These proteins are involved in several cell cycle stages, like proliferation, growth, cytokine production, and stress response, controlling and regulating transduction signaling pathways [178]. It has been shown that the main pathway of MAPKs involved in MAYV replication is p38 since the addition of the p38 inhibitor (SB203580) leads to a severe reduction in infection and the production of viable particles [177]. Studies carried out with enteroviruses [179] and SARS-CoV-2 [144] found that this pathway interferes directly with the synthesis of viral proteins. When treating MAYV infection with two compounds that act on this pathway, NR-7h (which blocks several isoforms of p38) and losmapimod (a compound used in Phase 2 clinical study for the treatment of individuals with facioscapulohumeral muscular dystrophy, which blocks p38) there is a reduction in the expression of E1 [177].

Another family of protein kinases, the proviral integration sites of Moloney murine leukemia virus (PIMs), was evaluated during MAYV infection [180]. PIMs act in different cellular pathways, including migration, metabolism, and proliferation, and are closely linked to the prognosis of some cancers, such as colon, pancreatic and prostatic [181–183]. Studies using an in vitro model have shown that PIM 1 inhibitor 2 (isoform 1 only) and AZD1208 (pan-PIM kinase inhibitor for all PIM isoforms) show decreased rates of MAYV infection, viral progeny and protein synthesis of E1 and nsP1 [184]. This activity was verified during ZIKV and UNAV infections but not in CHIKV [185,186].

#### 4. Conclusions

In this review, we describe compounds that are potentially effective against MAYV infection. They include synthetic molecules extracted from natural products as well as approved medicines already used to treat other diseases. Drug repurposing seems to be a promising strategy since the toxicity parameters have already been determined for use in humans, making the final approval by regulatory agencies faster than with other drugs. Still, non-commercial compounds (synthetic or extracted from plants) do not have safety test data, as most are in the preclinical development stages. Despite this, chemical engineering can benefit and improve molecules that have promising inhibitory results, both the synthetic ones and those isolated from natural extracts. Chemical engineering of molecules could lead to reduced toxicity, as well as high antiviral activity in drugs.

Considering that MAYV infection causes an acute and debilitating disease and the recent spread of this virus to broader regions in Brazil and South America [10,14,187–189], there is an urgent need for effective anti-MAYV compounds. Additionally, the lack of knowledge on the precise mechanism of MAYV replication and pathogenesis makes this neglected emergent virus a potential threat to all tropical and sub-tropical areas of the globe. Finally, further studies on MAYV replication and pathogenesis, including animal models, are essential for the future development of new, effective, and safe anti-MAYV drugs.

**Funding:** C.N.D.d.S. (307176-2018-5) and J.B. (312671/2020-2 and 205096/2018-2) are CNPq fellows. A.P.A. is a Ph.D. fellow from CAPES, Brazil.

**Acknowledgments:** Wagner Nagib for the graphic design of the figures.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

1. Calisher, C.H.; Karabatsos, N. Arbovirus Serogroups: Definition and Distribution. In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*; Monath, T.P., Ed.; CRC Press: New York, NY, USA, 1988; pp. 19–57.
2. Knipe, D.M.; Howley, P.M. *Fields Virology*, 6th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; ISBN 9780849340871.
3. da Saúde, M. Boletim de Vigilância Laboratorial Dos Arbovírus. *Bol. Epidemiológico* **2021**, *52*, 7–18.

4. Coffey, L.L.; Forrester, N.; Tssetsarkin, K.; Vasilakis, N.; Weaver, S.C. Factors Shaping the Adaptive Landscape for Arboviruses: Implications for the Emergence of Disease. *Future Microbiol.* **2013**, *8*, 155–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Travassos da Rosa, A.; Shope, R.; Pinheiro, F.; Travassos da Rosa, J.; Vasconcelos, P.; Herve, J.; Degallier, N. Arbovirus Research in the Brazilian Amazon. In Proceedings of the Fifth Symposium on Arbovirus Research in Australia, Brisbane, Australia, 28 August–1 September 1989; pp. 4–8.
6. Zanluca, C.; De Melo, V.C.A.; Mosimann, A.L.P.; Dos Santos, G.I.V.; dos Santos, C.N.D.; Luz, K. First Report of Autochthonous Transmission of Zika Virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 569–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Albuquerque, I.G.C.D.; Marandino, R.; Mendonça, A.P.; Nogueira, R.M.R.; Vasconcelos, P.F.D.C.; Guerra, L.R.; Brandão, B.C.; Mendonça, A.P.P.; Aguiar, G.R.; Baccho, P.A.M.D. Chikungunya Virus Infection: Report of the First Case Diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2012**, *45*, 128–129. [[CrossRef](#)]
8. Pezzi, L.; Rodriguez-Morales, A.J.; Reusken, C.B.; Ribeiro, G.S.; LaBeaud, A.D.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Brasil, P.; Lecuit, M.; Failloux, A.B.; Gallian, P.; et al. GloPID-R Report on Chikungunya, o'nyong-Nyong and Mayaro Virus, Part 3: Epidemiological Distribution of Mayaro Virus. *Antivir. Res.* **2019**, *172*, 104610. [[CrossRef](#)]
9. Lopes, N.; Nozawa, C.; Linhares, R.E.C. Características Gerais e Epidemiologia Dos Arbovirus Emergentes No Brasil. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* **2014**, *5*, 55–64. [[CrossRef](#)]
10. Saatkamp, C.J.; Rodrigues, L.R.R.; Pereira, A.M.N.; Coelho, J.A.; Marques, R.G.B.; Souza, V.C.D.; Nascimento, V.A.D.; Saatkamp, J.G.D.S.; Naveca, F.G.; Figueiredo, R.M.P.D. Mayaro Virus Detection in the Western Region of Pará State, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2021**, *54*, 1–3. [[CrossRef](#)]
11. Romeiro, M.F.; Fumagalli, M.J.; dos Anjos, A.B.; Figueiredo, L.T.M. Serological Evidence of Mayaro Virus Infection in Blood Donors from São Carlos, São Paulo, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2020**, *114*, 693–696. [[CrossRef](#)]
12. Brunini, S.; França, D.D.S.; Silva, J.B.; Silva, L.N.; Silva, F.P.A.; Spadoni, M.; Rezza, G. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1025–1026. [[CrossRef](#)]
13. Coimbra, T.L.M.; Santos, C.L.S.; Suzuki, A.; Petrella, S.M.C.; Bisordi, I.; Nagamori, A.H.; Marti, A.T.; Santos, R.N.; Fialho, D.M.; Lavigne, S.; et al. Mayaro Virus: Imported Cases of Human Infection in São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2007**, *49*, 221–224. [[CrossRef](#)]
14. de Paula Silveira-Lacerda, E.; Laschuk Herlinger, A.; Tanuri, A.; Rezza, G.; Anunciação, C.E.; Ribeiro, J.P.; Tannous, I.P.; Abrantes, G.R.; da Silva, E.G.; Arruda, K.F.; et al. Molecular Epidemiological Investigation of Mayaro Virus in Febrile Patients from Goiania City, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *95*, 104981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Esposito, D.L.A.; Fonseca, B.A.L.d. Will Mayaro Virus Be Responsible for the next Outbreak of an Arthropod-Borne Virus in Brazil? *Braz. J. Infect. Dis.* **2017**, *21*, 540–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Azevedo, R.S.S.; Chiang, J.O.; Martins, L.C.; Viana, G.M.R. Monitoramento de Casos de Febre Do Mayaro e Febre Do Oropouche Até a Semana Epidemiológica 35, 2019. *Bol. Epidemiológico* **2019**, *50*, 14–16.
17. Lorenz, C.; Ribeiro, A.F.; Chiaravalloti-neto, F. Mayaro Virus Distribution in South America. *Acta Trop.* **2019**, *198*, 105093. [[CrossRef](#)]
18. Webb, E.M.; Azar, S.R.; Haller, S.L.; Langsjoen, R.M.; Cuthbert, C.E.; Ramjag, A.T.; Luo, H.; Plante, K.; Wang, T.; Simmons, G.; et al. Effects of Chikungunya Virus Immunity on Mayaro Virus Disease and Epidemic Potential. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20399. [[CrossRef](#)]
19. Fumagalli, M.J.; de Souza, W.M.; de Castro-Jorge, L.A.; de Carvalho, R.V.H.; Castro, Í.A.; de Almeida, L.G.N.; Consonni, S.R.; Zamboni, D.S.; Figueiredo, L.T.M. Chikungunya Virus Exposure Partially Cross-Protects against Mayaro Virus Infection in Mice. *J. Virol.* **2021**, *95*, e01122-21. [[CrossRef](#)]
20. Malonis, R.J.; Earnest, J.T.; Kim, A.S.; Angeliadis, M.; Holtsberg, F.W.; Javad Aman, M.; Jangra, R.K.; Chandran, K.; Daily, J.P.; Diamond, M.S.; et al. Near-Germline Human Monoclonal Antibodies Neutralize and Protect against Multiple Arthritogenic Alphaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2100104118. [[CrossRef](#)]
21. de Figueiredo, M.L.G.; Figueiredo, L.T.M. Emerging Alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2014**, *47*, 677–683. [[CrossRef](#)]
22. Lima, W.G.; Pereira, R.S.; da Cruz Nizer, W.S.; Brito, J.C.M.; Godói, I.P.; Cardoso, V.N.; Fernandes, S.O.A.; Ferreira, J.M.S. Rate of Exposure to Mayaro Virus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arch. Virol.* **2021**, *166*, 347–361. [[CrossRef](#)]
23. da Costa, V.G.; de Rezende Féres, V.C.; Saivish, M.V.; de Lima Gimaque, J.B.; Moreli, M.L. Silent Emergence of Mayaro and Oropouche Viruses in Humans in Central Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *62*, 84–85. [[CrossRef](#)]
24. Filho, P.; de Paula, F. Epidemias Simultâneas de Mayaro e Febre Amarela Em Belterra, Pará. *Bol. Epidemiológico* **1978**, *10*, 146–152.
25. Anderson, C.R.; Downs, W.G.; Wattley, G.H.; Ahin, N.W.; Reese, A.A. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent: II. Isolation from Blood of Patients in Trinidad, B.W.I. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1957**, *6*, 1012–1016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Diagne, C.T.; Bengue, M.; Choumet, V.; Hamel, R.; Pompon, J.; Missé, D. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens* **2020**, *9*, 738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. McGill, P.E. Viral Infections:  $\alpha$ -Viral Arthropathy. *Bailliere's Clin. Rheumatol.* **1995**, *9*, 145–150. [[CrossRef](#)]
28. Pinheiro, F.P.; Freitas, R.B.; Travassos da Rosa, J.F.; Gabbay, Y.B.; Mello, W.A.; LeDuc, J.W. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and Virological Findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1981**, *30*, 674–681. [[CrossRef](#)]
29. Theilacker, C.; Held, J.; Allering, L.; Emmerich, P.; Schmidt-Chanasit, J.; Kern, W.V.; Panning, M. Prolonged Polyarthralgia in a German Traveller with Mayaro Virus Infection without Inflammatory Correlates. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 2011–2014. [[CrossRef](#)]

30. do Rosário Casseb, A.; Casseb LM, N.; da Silva, S.P.; da Costa Vasconcelos, P.F. Arbovírus: Importante Zoonose Na Amazônia Brasileira. *Vet. Zootec.* **2013**, *20*, 9–21.
31. Lednicky, J.; Beau De Rochars, V.M.; Elbadry, M.; Loeb, J.; Telisma, T.; Chavannes, S.; Anilis, G.; Cella, E.; Ciccozzi, M.; Okech, B.; et al. Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2000–2002. [[CrossRef](#)]
32. Aguilar-Luis, M.A.; del Valle-Mendoza, J.; Sandoval, I.; Silva-Caso, W.; Mazulis, F.; Carrillo-Ng, H.; Tarazona-Castro, Y.; Martins-Luna, J.; Aquino-Ortega, R.; Peña-Tuesta, I.; et al. A Silent Public Health Threat: Emergence of Mayaro Virus and Co-Infection with Dengue in Peru. *BMC Res. Notes* **2021**, *14*, 29. [[CrossRef](#)]
33. Slegers, C.A.D.; Keuter, M.; Günther, S.; Schmidt-Chanasit, J.; van der Ven, A.J.; de Mast, Q. Persisting Arthralgia Due to Mayaro Virus Infection in a Traveler from Brazil: Is There a Risk for Attendants to the 2014 FIFA World Cup? *J. Clin. Virol.* **2014**, *60*, 317–319. [[CrossRef](#)]
34. Llagonne-Barets, M.; Icard, V.; Leparç-Goffart, I.; Prat, C.; Perpoint, T.; André, P.; Ramière, C. A Case of Mayaro Virus Infection Imported from French Guiana. *J. Clin. Virol.* **2016**, *77*, 66–68. [[CrossRef](#)]
35. Vieira, C.J.d.S.P.; da Silva, D.J.F.; Barreto, E.S.; Siqueira, C.E.H.; Colombo, T.E.; Ozanic, K.; Schmidt, D.J.; Drumond, B.P.; Mondini, A.; Nogueira, M.L.; et al. Detection of Mayaro Virus Infections during a Dengue Outbreak in Mato Grosso, Brazil. *Acta Trop.* **2015**, *147*, 12–16. [[CrossRef](#)]
36. Pereira, T.N.; Carvalho, F.D.; De Mendonça, S.F.; Rocha, M.N.; Moreira, L.A. Vector Competence of *Aedes Aegypti*, *Aedes Albopictus*, and *Culex Quinqüefasciatus* Mosquitoes for Mayaro Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0007518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. PAHO/WHO. *Epidemiological Alert: Mayaro Fever*; PAHO/WHO: Washington, DC, USA, 2019; pp. 1–5.
38. Mello, M.V.P.; Domingos, T.F.S.; Ferreira, D.F.; Ribeiro, M.M.J.; Ribeiro, T.P.; Rodrigues, C.R.; Souza, A.M.T. Antiviral Drug Discovery and Development for Mayaro Fever—What Do We Have so Far? *Mini-Rev. Med. Chem.* **2020**, *20*, 921–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lima-Camara, T.N. Arboviroses Emergentes e Novos Desafios Para a Saúde Pública No Brasil. *Rev. Saude Publica* **2016**, *50*, 1–7. [[CrossRef](#)]
40. Mezcencio, J.M.; de Souza, W.; Fonseca, M.E.; Rebello, M.A. Replication of Mayaro Virus in *Aedes Albopictus* Cells: An Electron Microscopic Study. *Arch. Virol.* **1989**, *104*, 299–308. [[CrossRef](#)]
41. Ribeiro-Filho, H.V.; Coimbra, L.D.; Cassago, A.; Rocha, R.P.F.; Guerra, J.V.d.S.; de Felicio, R.; Carnieli, C.M.; Leme, L.; Padilha, A.C.; Paes Leme, A.F.; et al. Cryo-EM Structure of the Mature and Infective Mayaro Virus at 4.4 Å Resolution Reveals Features of Arthritogenic Alphaviruses. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3038. [[CrossRef](#)]
42. Ramsey, J.; Mukhopadhyay, S. Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. *Viruses* **2017**, *9*, 228. [[CrossRef](#)]
43. Espósito, D.L.A.; da Fonseca, B.A.L. Complete Genome Sequence of Mayaro Virus (Togaviridae, Alphavirus) Strain BeAr 20290 from Brazil. *Genome Announc.* **2015**, *3*, 141660. [[CrossRef](#)]
44. Jose, J.; Snyder, J.E.; Kuhn, R.J. A Structural and Functional Perspective of Alphavirus Replication and Assembly. *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 837–856. [[CrossRef](#)]
45. Mezcencio, J.M.; Rebello, M.A. Mayaro Virus Proteins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1992**, *88*, 299–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Strauss, J.H.; Strauss, E.G. The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiol. Rev.* **1994**, *58*, 491–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lavergne, A.; Thoisy, D.; Lacoste, V.; Tolou, H.; Dussart, P.; Morvan, J.; Talarmin, A.; Kazanji, M. Mayaro Virus: Complete Nucleotide Sequence and Phylogenetic Relationships with Other Alphaviruses. *Virus Res.* **2006**, *117*, 283–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bakar, F.A.; Ng, L.F.P. Nonstructural Proteins of Alphavirus—Potential Targets for Drug Development. *Viruses* **2018**, *10*, 71. [[CrossRef](#)]
49. Carvalho, C.A.M.; Silva, J.L.; Oliveira, A.C.; Gomes, A.M.O. On the Entry of an Emerging Arbovirus into Host Cells: Mayaro Virus Takes the Highway to the Cytoplasm through Fusion with Early Endosomes and Caveolae-Derived Vesicles. *PeerJ* **2017**, *5*, e3245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zhang, R.; Kim, A.S.; Fox, J.M.; Nair, S.; Basore, K.; Klimstra, W.B.; Rimkunas, R.; Fong, R.H.; Lin, H.; Poddar, S.; et al. Mxra8 Is a Receptor for Multiple Arthritogenic Alphaviruses. *Nature* **2018**, *557*, 570–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Kielian, M.; Chanel-vos, C.; Liao, M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses* **2010**, *2*, 796–825. [[CrossRef](#)]
52. Kononchik, J.P., Jr.; Hernandez, R.; Brown, D.T. An Alternative Pathway for Alphavirus Entry. *Virol. J.* **2011**, *8*, 304. [[CrossRef](#)]
53. Singh, I.; Helenius, A. Role of Ribosomes in Semliki Forest Virus Nucleocapsid Uncoating. *J. Virol.* **1992**, *66*, 7049–7058. [[CrossRef](#)]
54. Wengler, G.; Wengler, G. Identification of a Transfer of Viral Core Protein to Cellular Ribosomes during the Early Stages of Alphavirus Infection. *Virology* **1984**, *134*, 435–442. [[CrossRef](#)]
55. Wengler, G.; Würkner, D.; Wengler, G. Identification of a Sequence Element in the Alphavirus Core Protein Which Mediates Interaction of Cores with Ribosomes and the Disassembly of Cores. *Virology* **1992**, *191*, 880–888. [[CrossRef](#)]
56. Glanville, N.; Ranki, M.; Morser, J. Initiation of Translocation Directed by 42S and 26S RNAs from Semliki Forest Virus in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3059–3063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Pietilä, M.K.; Hellström, K.; Ahola, T. Alphavirus Polymerase and RNA Replication. *Virus Res.* **2017**, *234*, 44–57. [[CrossRef](#)]

58. Grimley, P.M.; Berezsky, I.K.; Friedman, R.M. Cytoplasmic Structures Associated with an Arbovirus Infection: Loci of Viral Ribonucleic Acid Synthesis. *J. Virol.* **1968**, *2*, 1326–1338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Friedman, R.M.; Levin, J.G.; Grimley, P.M.; Berezsky, I.K. Membrane-Associated Replication Complex in Arbovirus Infection. *J. Virol.* **1972**, *10*, 504–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Li, G.; Rice, C.M. The Signal for Translational Readthrough of a UGA Codon in Sindbis Virus RNA Involves a Single Cytidine Residue Immediately Downstream of the Termination Codon. *J. Virol.* **1993**, *67*, 5062–5067. [[CrossRef](#)]
61. Kallio, K.; Hellström, K.; Jokitalo, E.; Ahola, T. RNA Replication and Membrane Modification Require the Same Functions of Alphavirus Nonstructural Proteins. *J. Virol.* **2016**, *90*, 1687–1692. [[CrossRef](#)]
62. Shirako, Y.; Strauss, J.H. Cleavage between NsP1 and NsP2 Initiates the Processing Pathway of Sindbis Virus Nonstructural Polyprotein P123. *Virology* **1990**, *177*, 54–64. [[CrossRef](#)]
63. Lemm, J.A.; Rice, C.M. Assembly of Functional Sindbis Virus RNA Replication Complexes: Requirement for Coexpression of P123 and P34. *J. Virol.* **1993**, *67*, 1905–1915. [[CrossRef](#)]
64. Lemm, J.A.; Rümnapf, T.; Strauss, E.G.; Strauss, J.H.; Mrice, C. Polypeptide Requirements for Assembly of Functional Sindbis Virus Replication Complexes: A Model for the Temporal Regulation of Minus- and plus-Strand RNA Synthesis. *EMBO J.* **1994**, *13*, 2925–2934. [[CrossRef](#)]
65. Sawicki, D.L.; Sawicki, S.G. Short-Lived Minus-Strand Polymerase for Semliki Forest Virus. *J. Virol.* **1980**, *34*, 108–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sawicki, D.L.; Sawicki, S.G. Alphavirus Positive and Negative Strand RNA Synthesis and the Role of Polyproteins in Formation of Viral Replication Complexes. *Arch. Virol. Suppl.* **1994**, *9*, 393–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ishida, R.; Cole, J.; Lopez-Orozco, J.; Fayad, N.; Felix-Lopez, A.; Elaish, M.; Luo, S.Y.; Julien, O.; Kumar, A.; Hobman, T.C. Mayaro Virus Non-Structural Protein 2 Circumvents the Induction of Interferon in Part by Depleting Host Transcription Initiation Factor IIE Subunit 2. *Cells* **2021**, *10*, 3510. [[CrossRef](#)]
68. Rupp, J.C.; Sokolowski, K.J.; Gebhart, N.N.; Hardy, R.W. Alphavirus RNA Synthesis and Non-Structural Protein Functions. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 2483–2500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Adkins, S.; Stawicki, S.S.; Faurote, G.; Siegel, R.W.; Kao, C.C. Mechanistic Analysis of RNA Synthesis by RNA-Dependent RNA Polymerase from Two Promoters Reveals Similarities to DNA-Dependent RNA Polymerase. *RNA* **1998**, *4*, 455–470. [[PubMed](#)]
70. Fros, J.J.; Pijlman, G.P. Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses. *Viruses* **2016**, *8*, 166. [[CrossRef](#)]
71. Mezenzio, J.M.; de Souza, W.; Fonseca, M.E.; Rebello, M.A. Ultrastructural Study of Mayaro Virus Replication in BHK-21 Cells. *Arch. Virol.* **1990**, *114*, 229–235. [[CrossRef](#)]
72. Nieva, J.L.; Madan, V.; Carrasco, L. Viroporins: Structure and Biological Functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 563–574. [[CrossRef](#)]
73. Snyder, J.E.; Kulcsar, K.A.; Schultz, K.L.W.; Riley, C.P.; Neary, J.T.; Marr, S.; Jose, J.; Griffin, D.E.; Kuhn, R.J. Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. *J. Virol.* **2013**, *87*, 8511–8523. [[CrossRef](#)]
74. Firth, A.E.; Chung, B.Y.W.; Fleton, M.N.; Atkins, J.F. Discovery of Frameshifting in Alphavirus 6K Resolves a 20-Year Enigma. *Virol. J.* **2008**, *5*, 108. [[CrossRef](#)]
75. Rogers, K.J.; Jones-Burrage, S.; Maury, W.; Mukhopadhyay, S. TF Protein of Sindbis Virus Antagonizes Host Type I Interferon Responses in a Palmitoylation-Dependent Manner. *Virology* **2020**, *542*, 63–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Llamas-González, Y.Y.; Campos, D.; Pascale, J.M.; Arbiza, J.; González-Santamaría, J. A Functional Ubiquitin-Proteasome System Is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses. *Viruses* **2019**, *11*, 370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mota, M.T.D.O.; Ribeiro, M.R.; Vedovello, D.; Nogueira, M.L. Mayaro Virus: A Neglected Arbovirus of the Americas. *Future Virol.* **2015**, *10*, 1109–1122. [[CrossRef](#)]
78. Brown, R.S.; Wan, J.J.; Kielian, M. The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. *Viruses* **2018**, *10*, 89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Liu, N.; Brown, D.T. Phosphorylation and Dephosphorylation Events Play Critical Roles in Sindbis Virus Maturation. *Virology* **1993**, *196*, 703–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Strauss, J.H.; Strauss, E.G.; Kuhn, R.J. Budding of Alphaviruses. *Trends Microbiol.* **1995**, *3*, 346–350. [[CrossRef](#)]
81. Zhao, H.; Garoff, H. Role of Cell Surface Spikes in Alphavirus Budding. *J. Virol.* **1992**, *66*, 7089–7095. [[CrossRef](#)]
82. West, J.; Hernandez, R.; Ferreira, D.; Brown, D.T. Mutations in the Endodomain of Sindbis Virus Glycoprotein E2 Define Sequences Critical for Virus Assembly. *J. Virol.* **2006**, *80*, 4458–4468. [[CrossRef](#)]
83. Jose, J.; Taylor, A.B.; Kuhn, R.J. Spatial and Temporal Analysis of Alphavirus Replication and Assembly in Mammalian and Mosquito Cells. *MBio* **2017**, *8*, e02294-16. [[CrossRef](#)]
84. Hahon, N.; Zimmerman, W.D. Chikungunya Virus Infection of Cell Monolayers by Cell-to-Cell and Extracellular Transmission. *Appl. Microbiol.* **1970**, *19*, 389–391. [[CrossRef](#)]
85. Radoshitzky, S.R.; Pegoraro, G.; Chi, X.; Dong, L.; Chiang, C.Y.; Jozwick, L.; Clester, J.C.; Cooper, C.L.; Courier, D.; Langan, D.P.; et al. siRNA Screen Identifies Trafficking Host Factors That Modulate Alphavirus Infection. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Rao, S.; Taylor, A. Arthritogenic Alphavirus Capsid Protein. *Life* **2021**, *11*, 230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Mahauad-Fernandez, W.D.; Jones, P.H.; Okeoma, C.M. Critical Role for Bone Marrow Stromal Antigen 2 in Acute Chikungunya Virus Infection. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 2450–2461. [[CrossRef](#)]
88. Ooi, Y.S.; Dubé, M.; Kielian, M. BST2/Tetherin Inhibition of Alphavirus Exit. *Viruses* **2015**, *7*, 2147–2167. [[CrossRef](#)]
89. Jones, P.H.; Maric, M.; Madison, M.N.; Maury, W.; Roller, R.J.; Okeoma, C.M. BST-2/Tetherin-Mediated Restriction of Chikungunya (CHIKV) VLP Budding Is Counteracted by CHIKV Non-Structural Protein 1 (NsP1). *Virology* **2013**, *438*, 37–49. [[CrossRef](#)]
90. Martinez, M.G.; Snapp, E.-L.; Perumal, G.S.; Macaluso, F.P.; Kielian, M. Imaging the Alphavirus Exit Pathway. *J. Virol.* **2014**, *88*, 6922–6933. [[CrossRef](#)]
91. Jose, J.; Przybyla, L.; Edwards, T.J.; Perera, R.; Burgner, J.W.; Kuhn, R.J. Interactions of the Cytoplasmic Domain of Sindbis Virus E2 with Nucleocapsid Cores Promote Alphavirus Budding. *J. Virol.* **2012**, *86*, 2585–2599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Martinez, M.G.; Kielian, M. Intercellular Extensions Are Induced by the Alphavirus Structural Proteins and Mediate Virus Transmission. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1006061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Lee, C.Y.; Kam, Y.W.; Fric, J.; Malleret, B.; Koh, E.G.L.; Prakash, C.; Huang, W.; Lee, W.W.L.; Lin, C.; Lin, R.T.P.; et al. Chikungunya Virus Neutralization Antigens and Direct Cell-to-Cell Transmission Are Revealed by Human Antibody-Escape Mutants. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002390. [[CrossRef](#)]
94. Labadie, K.; Larcher, T.; Joubert, C.; Mannioui, A.; Delache, B.; Brochard, P.; Guigand, L.; Dubreil, L.; Lebon, P.; Verrier, B.; et al. Chikungunya Disease in Nonhuman Primates Involves Long-Term Viral Persistence in Macrophages. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 894–906. [[CrossRef](#)]
95. Hoarau, J.-J.; Jaffar Bandjee, M.-C.; Krejbich Trotot, P.; Das, T.; Li-Pat-Yuen, G.; Dassa, B.; Denizot, M.; Guichard, E.; Ribera, A.; Henni, T.; et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 5914–5927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Fung, M.; Thornton, A.; Mybeck, K.; Wu, J.H.H.; Hornbuckle, K.; Muniz, E. Evaluation of the Characteristics of Safety Withdrawal of Prescription Drugs from Worldwide Pharmaceutical Markets-1960 to 1999. *Ther. Innov. Regul. Sci.* **2001**, *35*, 293–317. [[CrossRef](#)]
97. Martin, H.L.; Adams, M.; Higgins, J.; Bond, J.; Morrison, E.E.; Bell, S.M.; Warriner, S.; Nelson, A.; Tomlinson, D.C. High-Content, High-Throughput Screening for the Identification of Cytotoxic Compounds Based on Cell Morphology and Cell Proliferation Markers. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Cruz, D.J.M.; Koishi, A.C.; Taniguchi, J.B.; Li, X.; Milan Bonotto, R.; No, J.H.; Kim, K.H.; Baek, S.; Kim, H.Y.; Windisch, M.P.; et al. High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Aguiar, A.C.C.; Murce, E.; Cortopassi, W.A.; Pimentel, A.S.; Almeida, M.M.F.S.; Barros, D.C.S.; Guedes, J.S.; Meneghetti, M.R.; Kretzli, A.U. Chloroquine Analogs as Antimalarial Candidates with Potent in Vitro and in Vivo Activity. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2018**, *8*, 459–464. [[CrossRef](#)]
100. Quartuccio, L.; Zabotti, A.; Del Zotto, S.; Zanier, L.; De Vita, S.; Valent, F. Risk of Serious Infection among Patients Receiving Biologics for Chronic Inflammatory Diseases: Usefulness of Administrative Data. *J. Adv. Res.* **2019**, *15*, 87–93. [[CrossRef](#)]
101. Ferreira, P.G.; Ferraz, A.C.; Figueiredo, J.E.; Lima, C.F.; Rodrigues, V.G.; Taranto, A.G.; Ferreira, J.M.S.; Brandão, G.C.; Vieira-Filho, S.A.; Duarte, L.P.; et al. Detection of the Antiviral Activity of Epicatechin Isolated from Salacia Crassifolia (Celastraceae) against Mayaro Virus Based on Protein C Homology Modelling and Virtual Screening. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 1567–1576. [[CrossRef](#)]
102. Campos, D.; Navarro, S.; Llamas-González, Y.Y.; Sugasti, M.; González-Santamaría, J. Broad Antiviral Activity of Ginkgolic Acid against Chikungunya, Mayaro, Una, and Zika Viruses. *Viruses* **2020**, *12*, 449. [[CrossRef](#)]
103. Neris, R.L.S.; Figueiredo, C.M.; Higa, L.M.; Araujo, D.F.; Carvalho, C.A.M.; Verçoza, B.R.F.; Silva, M.O.L.; Carneiro, F.A.; Tanuri, A.; Gomes, A.M.O.; et al. Co-Protoporphyrin IX and Sn-Protoporphyrin IX Inactivate Zika, Chikungunya and Other Arboviruses by Targeting the Viral Envelope. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9805. [[CrossRef](#)]
104. Salles, T.S.; Meneses, M.D.F.; Yamamoto, K.A.; Sá-Guimarães, T.E.; Caldas, L.A.; Silva, J.H.S.; da Silva Ferreira, P.; Amaral, A.C.F.; Ventura, J.A.; Azevedo, R.C.; et al. Chemical Composition and Anti-Mayaro Virus Activity of Schinus Terebinthifolius Fruits. *VirusDisease* **2021**, *32*, 526–534. [[CrossRef](#)]
105. Salles, T.S.; Meneses, M.D.F.; Caldas, L.A.; Sá-Guimarães, T.E.; de Oliveira, D.M.; Ventura, J.A.; Azevedo, R.C.; Kuster, R.M.; Soares, M.R.; Ferreira, D.F. Virucidal and Antiviral Activities of Pomegranate (*Punica Granatum*) Extract against the Mosquito-Borne Mayaro Virus. *Parasites Vectors* **2021**, *14*, 443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Du, R.; Cooper, L.; Chen, Z.; Lee, H.; Rong, L.; Cui, Q. Discovery of Chebulagic Acid and Punicalagin as Novel Allosteric Inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro. *Antivir. Res.* **2021**, *190*, 105075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Spindola, K.C.W.; Simas, N.K.; Salles, T.S.; De Meneses, M.D.F.; Sato, A.; Ferreira, D.; Romão, W.; Kuster, R.M. Anti-Mayaro Virus Activity of Cassia Australis Extracts (Fabaceae, Leguminosae). *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Carvalho, C.A.M.; Sousa, I.P.; Silva, J.L.; Oliveira, A.C.; Gonçalves, R.B.; Gomes, A.M.O. Inhibition of Mayaro Virus Infection by Bovine Lactoferrin. *Virology* **2014**, *452–453*, 297–302. [[CrossRef](#)]
109. Langendries, L.; Abdelnabi, R.; Neyts, J.; Delang, L. Repurposing Drugs for Mayaro Virus: Identification of Eidd-1931, Favipiravir and Suramin as Mayaro Virus Inhibitors. *Microorganisms* **2021**, *9*, 734. [[CrossRef](#)]
110. Albulescu, I.C.; White-Scholten, L.; Tas, A.; Hoornweg, T.E.; Ferla, S.; Kovacicova, K.; Smit, J.M.; Brancale, A.; Snijder, E.J.; van Hemert, M.J. Suramin Inhibits Chikungunya Virus Replication by Interacting with Virions and Blocking the Early Steps of Infection. *Viruses* **2020**, *12*, 314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

111. Klimstra, W.B.; Ryman, K.D.; Johnston, R.E. Adaptation of Sindbis Virus to BHK Cells Selects for Use of Heparan Sulfate as an Attachment Receptor. *J. Virol.* **1998**, *72*, 7357–7366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Klimstra, W.B.; Nangle, E.M.; Smith, M.S.; Yurochko, A.D.; Ryman, K.D. DC-SIGN and L-SIGN Can Act as Attachment Receptors for Alphaviruses and Distinguish between Mosquito Cell- and Mammalian Cell-Derived Viruses. *J. Virol.* **2004**, *78*, 7862. [[CrossRef](#)]
113. La Linn, M.; Eble, J.A.; Lübken, C.; Slade, R.W.; Heino, J.; Davies, J.; Suhrbier, A. An Arthritogenic Alphavirus Uses the A1β1 Integrin Collagen Receptor. *Virology* **2005**, *336*, 229–239. [[CrossRef](#)]
114. Earnest, J.T.; Basore, K.; Roy, V.; Bailey, A.L.; Wang, D.; Alter, G.; Fremont, D.H.; Diamond, M.S. Neutralizing Antibodies against Mayaro Virus Require Fc Effector Functions for Protective Activity. *J. Exp. Med.* **2019**, 2282–2301. [[CrossRef](#)]
115. Fox, J.M.; Long, F.; Edeling, M.A.; Lin, H.; Van Duijl-Richter, M.K.S.; Fong, R.H.; Kahle, K.M.; Smit, J.M.; Jin, J.; Simmons, G.; et al. Broadly Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind an Epitope on E2 and Inhibit Entry and Egress. *Cell* **2015**, *163*, 1095–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Kim, A.S.; Austin, S.K.; Gardner, C.L.; Zuiani, A.; Reed, D.S.; Trobaugh, D.W.; Sun, C.; Basore, K.; Williamson, L.E.; Crowe, J.E.; et al. Protective Antibodies against Eastern Equine Encephalitis Virus Bind to Epitopes in Domains A and B of the E2 Glycoprotein. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 187–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Grabarz, F.; Paulo, A.; Lopes, Y.; Barazzone, G.C.; Santos, J.C.; Botosso, V.F.; Attie, S.; Jorge, C.; Lucia, A.; Oller, T.; et al. Strategies for the Production of Soluble Interferon-Alpha Consensus and Potential Application in Arboviruses and SARS-CoV-2. *Life* **2021**, *11*, 460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Maheshwari, R.K.; Sidhu, G.S.; Singh, A.K.; Sivaram, S.S.; Kinchington, P.R.; Hay, J.; Friedman, R.M. Defective Transport of Herpes Simplex Virus Glycoprotein in Interferon-Treated Cells: Role of Intracellular PH. *J. Interferon Res.* **1994**, *14*, 319–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Ferreira, D.F.; Rebello, M.C.S. Interferon Selectively Inhibits the Synthesis of Mayaro Virus Glycoproteins. *Rev. Microbiol.* **1998**, *29*, 219–221. [[CrossRef](#)]
120. Rebello, M.C.; Fonseca, M.E.; Marinho, J.O.; Rebello, M.A. Studies on the Replication of Mayaro Virus Grown in Interferon Treated Cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1994**, *89*, 619–623. [[CrossRef](#)]
121. Maheshwari, R.K.; Sidhu, G.S.; Bhartiya, D.; Friedman, R.M. Primary Amines Enhance the Antiviral Activity of Interferon against a Membrane Virus: Role of Intracellular PH. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*, 2143–2152. [[CrossRef](#)]
122. Li, J.; Kemper, T.; Broering, R.; Chen, J.; Yuan, Z.; Wang, X.; Lu, M. Interferon Alpha Induces Cellular Autophagy and Modulates Hepatitis B Virus Replication. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 27. [[CrossRef](#)]
123. Murgue, B.; Domart, Y.; Coudrier, D.; Rollin, P.E.; Darchis, J.P. Efficacy of Interferon Alpha-2b and Ribavirin against West Nile Virus In Vitro. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 107–108.
124. Livonesi, M.C.; De Moro Sousa, R.L.; Badra, S.J.; Figueiredo, L.T.M. In Vitro and in Vivo Studies of Ribavirin Action on Brazilian Orthobunyavirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 1011–1016. [[CrossRef](#)]
125. Graci, J.D.; Cameron, C.E. Mechanisms of Action of Ribavirin against Distinct Viruses. *Rev. Med. Virol.* **2006**, *16*, 37–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Cummings, K.J.; Lee, S.M.; West, E.S.; Cid-Ruzafa, J.; Fein, S.G.; Aoki, Y.; Sulkowski, M.S.; Goodman, S.N. Interferon and Ribavirin vs Interferon Alone in the Re-Treatment of Chronic Hepatitis C Previously Nonresponsive to Interferon a Meta-Analysis of Randomized Trials. *J. Am. Med. Assoc.* **2001**, *285*, 193–199. [[CrossRef](#)]
127. Ravichandran, R.; Manian, M. Ribavirin Therapy for Chikungunya Arthritis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2008**, *2*, 140–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Andrei, G.; De Clercq, E. Molecular Approaches for the Treatment of Hemorrhagic Fever Virus Infections. *Antivir. Res.* **1993**, *22*, 45–75. [[CrossRef](#)]
129. Briolant, S.; Garin, D.; Scaramozzino, N.; Jouan, A.; Crance, J.M. In Vitro Inhibition of Chikungunya and Semliki Forest Viruses Replication by Antiviral Compounds: Synergistic Effect of Interferon-α and Ribavirin Combination. *Antivir. Res.* **2004**, *61*, 111–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Rothan, H.A.; Bahrani, H.; Mohamed, Z.; Teoh, T.C.; Shankar, E.M.; Rahman, N.A.; Yusof, R. A Combination of Doxycycline and Ribavirin Alleviated Chikungunya Infection. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126360. [[CrossRef](#)]
131. Dos Santos, A.E.; Kuster, R.M.; Yamamoto, K.A.; Salles, T.S.; Campos, R.; De Meneses, M.D.F.; Soares, M.R.; Ferreira, D. Quercetin and Quercetin 3-O-Glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. Show Anti-Mayaro Virus Activity. *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 130. [[CrossRef](#)]
132. Zandi, K.; Teoh, B.T.; Sam, S.S.; Wong, P.F.; Mustafa, M.; Abubakar, S. Antiviral Activity of Four Types of Bioflavonoid against Dengue Virus Type-2. *Virol. J.* **2011**, *8*, 560. [[CrossRef](#)]
133. Amorim, R.; de Meneses, M.D.F.; Borges, J.C.; da Silva Pinheiro, L.C.; Caldas, L.A.; Cirne-Santos, C.C.; de Mello, M.V.P.; de Souza, A.M.T.; Castro, H.C.; de Palmer Paixão, I.C.N.; et al. Thieno[2,3-b]Pyridine Derivatives: A New Class of Antiviral Drugs against Mayaro Virus. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 1577–1587. [[CrossRef](#)]
134. Ferreira, D.F.; Santo, M.P.E.; Rebello, M.A.; Rebello, M.C.S. Weak Bases Affect Late Stages of Mayaro Virus Replication Cycle in Vertebrate Cells. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 313–318. [[CrossRef](#)]

135. Ehteshami, M.; Tao, S.; Zandi, K.; Hsiao, H.-M.; Jiang, Y.; Hammond, E.; Amblard, F.; Russell, O.O.; Merits, A.; Schinazi, R.F. Characterization of B-D-N<sup>4</sup>-Hydroxycytidine as a Novel Inhibitor of Chikungunya Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02395-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Delang, L.; Guerrero, N.S.; Tas, A.; Quérat, G.; Pastorino, B.; Froeyen, M.; Dallmeier, K.; Jochmans, D.; Herdewijn, P.; Bello, F.; et al. Mutations in the Chikungunya Virus Non-Structural Proteins Cause Resistance to Favipiravir (T-705), a Broad-Spectrum Antiviral. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 2770–2784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Urakova, N.; Kuznetsova, V.; Crossman, D.K.; Sokratian, A.; Guthrie, D.B.; Kolykhalov, A.A.; Lockwood, M.A.; Natchus, M.G.; Crowley, M.R.; Painter, G.R.; et al.  $\beta$ -d-N<sup>4</sup>-Hydroxycytidine Is a Potent Anti-Alphavirus Compound That Induces a High Level of Mutations in the Viral Genome. *J. Virol.* **2018**, *92*, e01965-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Bengue, M.; Pintong, A.R.; Liegeois, F.; Nougairède, A.; Hamel, R.; Pompon, J.; de Lamballerie, X.; Roques, P.; Choumet, V.; Missé, D. Favipiravir Inhibits Mayaro Virus Infection in Mice. *Viruses* **2021**, *13*, 2213. [[CrossRef](#)]
139. Abdelnabi, R.; Jochmans, D.; Verbeken, E.; Neyts, J.; Delang, L. Antiviral Treatment Efficiently Inhibits Chikungunya Virus Infection in the Joints of Mice during the Acute but Not during the Chronic Phase of the Infection. *Antivir. Res.* **2018**, *149*, 113–117. [[CrossRef](#)]
140. Julander, J.G.; Smee, D.F.; Morrey, J.D.; Furuta, Y. Effect of T-705 Treatment on Western Equine Encephalitis in a Mouse Model. *Antivir. Res.* **2009**, *82*, 169–171. [[CrossRef](#)]
141. Ertem, O.; Guner, O.; Incir, C.; Kalkan, S.; Gelal, A. The Outcomes of Favipiravir Exposure in Pregnancy: A Case Series. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2022**. [[CrossRef](#)]
142. Ingley, E. Src Family Kinases: Regulation of Their Activities, Levels and Identification of New Pathways. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteom.* **2008**, *1784*, 56–65. [[CrossRef](#)]
143. Bouhaddou, M.; Memon, D.; Meyer, B.; White, K.M.; Rezelj, V.V.; Correa Marrero, M.; Polacco, B.J.; Melnyk, J.E.; Ulferts, S.; Kaake, R.M.; et al. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell* **2020**, *182*, 685–712.e19. [[CrossRef](#)]
144. Broeckel, R.; Sarkar, S.; May, N.A.; Totonchy, J.; Kreklywich, C.N.; Smith, P.; Graves, L.; DeFilippis, V.R.; Heise, M.T.; Morrison, T.E.; et al. Src Family Kinase Inhibitors Block Translation of Alphavirus Subgenomic MRNAs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e02325-18. [[CrossRef](#)]
145. De Campos, R.M.; Ferreira, D.F.; Da Veiga, V.F.; Rebello, M.A.; Rebello, M.C.S. Effect of Monensin on Mayaro Virus Replication in Monkey Kidney and Aedes Albopictus Cells. *Acta Virol.* **2003**, *47*, 113–119. [[PubMed](#)]
146. Gall, B.; Pryke, K.; Abraham, J.; Mizuno, N.; Botto, S.; Sali, T.M.; Broeckel, R.; Haese, N.; Nilsen, A.; Placzek, A.; et al. Emerging Alphaviruses Are Sensitive to Cellular States Induced by a Novel Small-Molecule Agonist of the STING Pathway. *J. Virol.* **2018**, *92*, e01913-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Da Costa, L.J.; Rebello, M.A. Effect of Brefeldin A on Mayaro Virus Replication in Aedes Albopictus and Vero Cells. *Acta Virol.* **1999**, *43*, 357–360. [[PubMed](#)]
148. Burlandy, F.M.; Meneses, M.D.F. De Prostaglandin A 1 Inhibits the Replication of Sindbis Virus in Monkey Kidney and Mosquito Cells. *Rev. Ciênc. Médicas E Biológicas* **2008**, *7*, 169–174.
149. Santoro, M.G.; Jaffe, B.M.; Garaci, E.; Esteban, M. Antiviral Effect of Prostaglandins of the A Series: Inhibition of Vaccinia Virus Replication in Cultured Cells. *J. Gen. Virol.* **1982**, *63* 2, 435–440. [[CrossRef](#)]
150. Santoro, M.G.; Fukushima, M.; Benedetto, A.; Amici, C. PGJ2, a New Antiviral Prostaglandin: Inhibition of Sendai Virus Replication and Alteration of Virus Protein Synthesis. *J. Gen. Virol.* **1987**, *68 Pt 4*, 1153–1158. [[CrossRef](#)]
151. Burlandy, F.M.; Rebello, M.A. Inhibition of Mayaro Virus Replication by Prostaglandin A1 in Vero Cells. *Intervirology* **2001**, *44*, 344–349. [[CrossRef](#)]
152. Sivropoulou, A.; Nikolaou, C.; Papanikolaou, E.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of Salvia Fruticosa Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3197–3201. [[CrossRef](#)]
153. Shaguffa; Ahmad, I. Recent Insight into the Biological Activities of Synthetic Xanthone Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *116*, 267–280. [[CrossRef](#)]
154. da Silva, Í.E.P.; Lopes da Silva, M.; Dias, R.S.; Santos, E.G.; Brangioni de Paula, M.C.; Silva de Oliveira, A.; Costa da Silveira Oliveira, A.F.; Marques de Oliveira, F.; Canedo da Silva, C.; Teixeira, R.R.; et al. Xanthenedione (and Intermediates Involved in Their Synthesis) Inhibit Zika Virus Migration to the Central Nervous System in Murine Neonatal Models. *Microbes Infect.* **2020**, *22*, 489–499. [[CrossRef](#)]
155. Fernandes, L.S.; da Silva, M.L.; Dias, R.S.; Lucindo, M.S.d.S.; da Silva, Í.E.P.; Silva, C.C.; Teixeira, R.R.; de Paula, S.O. Evaluation of Antiviral Activity of Cyclic Ketones against Mayaro Virus. *Viruses* **2021**, *13*, 2123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Bakhache, W.; Neyret, A.; McKellar, J.; Clop, C.; Bernard, E.; Weger-Lucarelli, J.; Briant, L. Fatty Acid Synthase and Stearoyl-CoA Desaturase-1 Are Conserved Druggable Cofactors of Old World Alphavirus Genome Replication. *Antivir. Res.* **2019**, *172*, 104642. [[CrossRef](#)]
157. Pereira, H.S.; Rebello, M.A. Inhibition of Mayaro Virus Replication by Cerulenin in Aedes Albopictus Cells. *Acta Virol.* **1998**, *42*, 383–388. [[PubMed](#)]
158. Karpe, Y.A.; Pingale, K.D.; Kanade, G.D. Activities of Proteasome and M-Calpain Are Essential for Chikungunya Virus Replication. *Virus Genes* **2016**, *52*, 716–721. [[CrossRef](#)]
159. Contin, R.; Arnoldi, F.; Mano, M.; Burrone, O.R. Rotavirus Replication Requires a Functional Proteasome for Effective Assembly of Viroplasm. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2781–2792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

160. Satheshkumar, P.S.; Anton, L.C.; Sanz, P.; Moss, B. Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System Prevents Vaccinia Virus DNA Replication and Expression of Intermediate and Late Genes. *J. Virol.* **2009**, *83*, 2469–2479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Isaacson, M.K.; Ploegh, H.L. Ubiquitination, Ubiquitin-like Modifiers, and Deubiquitination in Viral Infection. *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 559–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Swatek, K.N.; Komander, D. Ubiquitin Modifications. *Cell Res.* **2016**, *26*, 399–422. [[CrossRef](#)]
163. Viswanathan, K.; Früh, K.; DeFilippis, V. Viral Hijacking of the Host Ubiquitin System to Evade Interferon Responses. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 517–523. [[CrossRef](#)]
164. La Frazza, S.; Amici, C.; Santoro, M.G. Antiviral Activity of Proteasome Inhibitors in Herpes Simplex Virus-1 Infection: Role of Nuclear Factor-KB. *Antivir. Ther.* **2006**, *11*, 995–1004. [[CrossRef](#)]
165. Watanabe, H.; Tanaka, Y.; Shimazu, Y.; Sugahara, F.; Kuwayama, M.; Hiramatsu, A.; Kiyotani, K.; Yoshida, T.; Sakaguchi, T. Cell-Specific Inhibition of Paramyxovirus Maturation by Proteasome Inhibitors. *Microbiol. Immunol.* **2005**, *49*, 835–844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Harty, R.N.; Brown, M.E.; McGettigan, J.P.; Wang, G.; Jayakar, H.R.; Huibregtse, J.M.; Whitt, M.A.; Schnell, M.J. Rhabdoviruses and the Cellular Ubiquitin-Proteasome System: A Budding Interaction. *J. Virol.* **2001**, *75*, 10623–10629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Schubert, U.; Ott, D.E.; Chertova, E.N.; Welker, R.; Tessmer, U.; Princiotta, M.F.; Bennink, J.R.; Kräusslich, H.G.; Yewdell, J.W. Proteasome Inhibition Interferes with Gag Polyprotein Processing, Release, and Maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13057–13062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Amaya, M.; Keck, F.; Lindquist, M.; Voss, K.; Scavone, L.; Kehn-Hall, K.; Roberts, B.; Bailey, C.; Schmaljohn, C.; Narayanan, A. The Ubiquitin Proteasome System Plays a Role in Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infection. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124792. [[CrossRef](#)]
169. Kisselev, A.F.; Goldberg, A.L. Proteasome Inhibitors: From Research Tools to Drug Candidates. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 739–758. [[CrossRef](#)]
170. Camini, F.C.; da Silva, T.F.; da Silva Caetano, C.C.; Almeida, L.T.; Ferraz, A.C.; Alves Vitoreti, V.M.; de Mello Silva, B.; de Queiroz Silva, S.; de Magalhães, J.C.; de Brito Magalhães, C.L. Antiviral Activity of Silymarin against Mayaro Virus and Protective Effect in Virus-Induced Oxidative Stress. *Antivir. Res.* **2018**, *158*, 8–12. [[CrossRef](#)]
171. Caetano, C.C.d.S.; Camini, F.C.; Almeida, L.T.; Ferraz, A.C.; da Silva, T.F.; Lima, R.L.S.; de Freitas Carvalho, M.M.; de Freitas Castro, T.; Carneiro, C.M.; de Mello Silva, B.; et al. Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress Is Associated With Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15289. [[CrossRef](#)]
172. Ferraz, A.C.; Almeida, L.T.; da Silva Caetano, C.C.; da Silva Menegatto, M.B.; Souza Lima, R.L.; de Senna, J.P.N.; de Oliveira Cardoso, J.M.; Perucci, L.O.; Talvani, A.; Geraldo de Lima, W.; et al. Hepatoprotective, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiviral Activities of Silymarin against Mayaro Virus Infection. *Antivir. Res.* **2021**, *194*, 105168. [[CrossRef](#)]
173. Tappe, D.; Pérez-Girón, J.V.; Just-Nübling, G.; Schuster, G.; Gómez-Medina, S.; Günther, S.; Muñoz-Fontela, C.; Schmidt-Chanasit, J. Sustained Elevated Cytokine Levels during Recovery Phase of Mayaro Virus Infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 750–752. [[CrossRef](#)]
174. Santiago, F.W.; Halsey, E.S.; Siles, C.; Vilcarromero, S.; Guevara, C.; Silvas, J.A.; Ramal, C.; Ampuero, J.S.; Aguilar, P.V. Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-Inflammatory Cytokine Response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004104. [[CrossRef](#)]
175. Camini, F.C.; da Silva Caetano, C.C.; Almeida, L.T.; da Costa Guerra, J.F.; de Mello Silva, B.; de Queiroz Silva, S.; de Magalhães, J.C.; de Brito Magalhães, C.L. Oxidative Stress in Mayaro Virus Infection. *Virus Res.* **2017**, *236*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Sugasti-Salazar, M.; Llamas-González, Y.Y.; Campos, D.; González-Santamaría, J. Inhibition of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Impairs Mayaro Virus Replication in Human Dermal Fibroblasts and HeLa Cells. *Viruses* **2021**, *13*, 1156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Plotnikov, A.; Zehorai, E.; Procaccia, S.; Seger, R. The MAPK Cascades: Signaling Components, Nuclear Roles and Mechanisms of Nuclear Translocation. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1619–1633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Peng, H.; Shi, M.; Zhang, L.; Li, Y.; Sun, J.; Zhang, L.; Wang, X.; Xu, X.; Zhang, X.; Mao, Y.; et al. Activation of JNK1/2 and P38 MAPK Signaling Pathways Promotes Enterovirus 71 Infection in Immature Dendritic Cells. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Santio, N.M.; Koskinen, P.J. PIM Kinases: From Survival Factors to Regulators of Cell Motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2017**, *93*, 74–85. [[CrossRef](#)]
180. Eerola, S.K.; Kohvakka, A.; Tammela, T.L.J.; Koskinen, P.J.; Latonen, L.; Visakorpi, T. Expression and ERG Regulation of PIM Kinases in Prostate Cancer. *Cancer Med.* **2021**, *10*, 3427–3436. [[CrossRef](#)]
181. Wu, J.; Chu, E.; Kang, Y. Pim Kinases in Multiple Myeloma. *Cancers* **2021**, *13*, 4304. [[CrossRef](#)]
182. Zhang, X.; Song, M.; Kundu, J.K.; Lee, M.-H.; Liu, Z.-Z. PIM Kinase as an Executional Target in Cancer. *J. Cancer Prev.* **2018**, *23*, 109–116. [[CrossRef](#)]
183. Keeton, E.K.; McEachern, K.; Dillman, K.S.; Palakurthi, S.; Cao, Y.; Grondine, M.R.; Kaur, S.; Wang, S.; Chen, Y.; Wu, A.; et al. AZD1208, a Potent and Selective Pan-Pim Kinase Inhibitor, Demonstrates Efficacy in Preclinical Models of Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2014**, *123*, 905–913. [[CrossRef](#)]
184. Sugasti-Salazar, M.; Campos, D.; Valdés-Torres, P.; González-Santamaría, J. Targeting Host PIM Protein Kinases Reduces MayaroVirus Replication. *Viruses* **2022**, *14*, 422. [[CrossRef](#)]

185. Zhou, F.; Wan, Q.; Chen, Y.; Chen, S.; He, M. liang PIM1 Kinase Facilitates Zika Virus Replication by Suppressing Host Cells' Natural Immunity. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 3–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Mutricy, R.; Matheus, S.; Mosnier, É.; Martínez-Lorenzi, E.; De Laval, F.; Nacher, M.; Niemetzky, F.; Naudion, P.; Djossou, F.; Rousset, D.; et al. Mayaro Virus Infection in French Guiana, a Cross Sectional Study 2003–2019. *Infect. Genet. Evol.* **2022**, *99*, 105243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. de Souza Costa, M.C.; Siqueira Maia, L.M.; Costa de Souza, V.; Gonzaga, A.M.; Correa de Azevedo, V.; Ramos Martins, L.; Chavez Pavoni, J.H.; Gomes Naveca, F.; Dezengrini Shlessarenko, R. Arbovirus Investigation in Patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya Virus Introduction in Brazil, 2015–2016. *Acta Trop.* **2019**, *190*, 395–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Salgado, B.B.; de Jesus Maués, F.C.; Pereira, R.L.; Chiang, J.O.; de Oliveira Freitas, M.N.; Ferreira, M.S.; Martins, L.C.; da Costa Vasconcelos, P.F.; Ganoza, C.; Lalwani, P. Prevalence of Arbovirus Antibodies in Young Healthy Adult Population in Brazil. *Parasites Vectors* **2021**, *14*, 403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Caicedo, E.Y.; Charniga, K.; Rueda, A.; Dorigatti, I.; Mendez, Y.; Hamlet, A.; Carrera, J.P.; Cucunubá, Z.M. The Epidemiology of Mayaro Virus in the Americas: A Systematic Review and Key Parameter Estimates for Outbreak Modelling. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009418. [[CrossRef](#)]

### **3. CAPÍTULO 2 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS QUÍMICOS SINTÉTICOS CONTRA O MAYARO VÍRUS**

Neste segundo capítulo são apresentados os dados de triagem, identificação e caracterização *in vitro* da atividade antiviral de compostos químicos sintéticos contra o MAYV. Estes dados, após serem discutidos durante a defesa da tese, serão publicados em revista ainda não definida.

Assim, aqui demonstramos a triagem de várias classes de compostos, dentre eles, flavonóides (naringenina e crisina, além de compostos derivados), carbamatos e alguns compostos da biblioteca FDA n°5932. 4 compostos foram classificados como mais promissores e, com eles, avançamos com alguns testes de mecanismo de ação durante o ciclo de replicação de MAYV. Todos os dados podem ser analisados abaixo.

## 4. OBJETIVO

Avaliar a atividade antiviral de compostos comerciais aprovadas para uso em humanos pela agência federal de administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (do inglês, Food and Drug Administration – FDA) e compostos sintéticos purificados, em modelo *in vitro*, na inibição da infecção pelo MAYV.

### 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**4.1.1** Analisar a citotoxicidade das substâncias usando um sistema de triagem de alto rendimento (*iHTS*) por imagem (imunofluorescência indireta - IFI);

**4.1.2** Padronizar e validar ensaios de triagem de atividade antiviral por *iHTS* contra infecções por MAYV;

**4.1.3** Determinar a atividade antiviral das substâncias por *iHTS* anti- MAYV;

**4.1.4** Determinar valores de concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ), concentração inibitória de 50% da infecção viral ( $IC_{50}$ ) e o índice de seletividade (IS) para a definição das substâncias que apresentarem melhor atividade;

**4.1.5** Analisar a atividade virucida dos compostos selecionados;

**4.1.6** Realizar ensaios de atividade antiviral com os compostos selecionados utilizando diferentes cepas virais do MAYV;

**4.1.7** Realizar ensaios de atividade antiviral dos compostos selecionados em diferentes linhagens celulares relevantes para o ciclo de transmissão viral e patogênese;

**4.1.8** Identificar os possíveis mecanismos de ação das substâncias com maior atividade no processo de inibição da infecção.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. CÉLULAS, CEPAS VIRAIS E COMPOSTOS

As linhagens celulares utilizadas nesse estudo foram: C6/36 (*Aedes albopictus*; ATCC CRL-1660), Vero E6 (macaco verde africano; ATCC CRL-1586), A549 (adenocarcinoma alveolar humano, ATCC CCL-185), Huh-7.5 (hepatocarcinoma humano; ATCC PTA-8561), A172 (glioblastoma humano; ATCC CRL-1620), SH-SY5Y (neuroblastoma humano; ATCC CRL-2266), THP-1 (leucemia monocítica aguda humano; ATCC TIB-202) e macrófagos derivados de THP-1 (Tabela 1). A diferenciação de THP-1 em macrófagos derivados de THP-1 foi induzida com 100 ng/ml de *phorbol myristate acetate* (PMA) por 48h. Todas as linhagens celulares supracitadas estão disponíveis no laboratório de Virologia Molecular do ICC/Fiocruz.

**Tabela 1:** Linhagens celulares utilizadas durante os experimentos e suas condições para cultivo.

Célula	Meio de cultivo	Suplementação	Cultivo
C6/36	Leibovitz L15	5% de soro bovino fetal (SBF) 25 µg/ml de gentamicina 0,26% de triptose	28°C
Vero E6	DMEM/F-12 <sup>#</sup>	10% de SBF	37°C
A549		14 mM de NaHCO <sub>3</sub>	5% de CO <sub>2</sub>
Huh-7.5		100 UI/ml de penicilina	
A172		100 µg/ml de estreptomicina	
SH-SY5Y			
THP-1	RPMI-1640*	2 mM glutamina	37°C
Macrófagos derivados de THP-1		10% de SBF 100 UI/ml de penicilina 100 µg/ml de estreptomicina 0,25 µg/ml anfotericina B 0,05 mM de β-mercaptoetanol	5% de CO <sub>2</sub> .

<sup>#</sup> Eagle modificado por Dulbecco/mistura nutriente F12 (DMEM/F-12)

\*Roswell Park Memorial Institute media 1640 com 2 mM L-Glutamine (RPMI-1640; Catalog #: BE12-702F; Lonza)

O estoque da cepa viral MAYV genótipo D (MAYV\_D) pertencente ao banco de vírus do Laboratório de Virologia Molecular do ICC/Fiocruz/PR e da cepa viral MAYV BeAr20290 (GenBank número KT754168) que foi generosamente cedida pela Dra.

Alessandra Abel Borges do Laboratório de Pesquisa em Virologia e Imunologia (LAPEVI) da Universidade Federal de Alagoas de Maceió/AL, foram amplificados em células C6/36 e titulados na mesma célula através do ensaio de formação de placa (ver protocolo 5.3).

Os compostos naringenina (pureza >95%; SC-203443; Santa Cruz Biotechnology), crisina (pureza = 97%; C80105; Sigma-Aldrich) e ribavirina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram diluídas à 20 mM em dimetilsulfóxido 100% (DMSO – Sigma-Aldrich). Interferon  $\alpha$ -2A (IFN- $\alpha$  2A; Blau Farmacêutica, Cotia, SP, Brazil) foi diluída à 1000 UI/ml. Os demais compostos (flavonóides derivados de naringenina ou de crisina e carbamatos) utilizadas na triagem foram sintetizadas pelo Dr. Mauro Vieira de Almeida da Universidade Federal de Juiz de Fora e diluídas em DMSO 100% (anexo I). A biblioteca *Tocriscreen* de compostos aprovados pelo FDA número 5932 foi adquirida e está alocada no laboratório de Virologia Molecular do ICC/Fiocruz/PR contendo 159 compostos à 10 mM diluídos em DMSO 100%, conforme recomendação do fabricante.

## 5.2. VALIDAÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS POR RT-PCR

Após a produção dos estoques virais de MAYV\_D, o RNA viral foi extraído via QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) e transformado em DNA complementar (cDNA) através da *ImProm II Reverse Transcription System kit* (Promega), segundo instruções dos fabricantes. Através do cDNA, foram realizados vários ensaios de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando iniciadores e ciclagem, segundo a Tabela 2 e seus respectivos artigos de referência. Os iniciadores para flavivírus genérico, aura vírus e denso vírus foram utilizados para verificar possíveis vírus contaminantes no estoque viral. O produto de PCR amplificado através dos iniciadores Alpha 1+ e Alpha 1- com o cDNA de MAYV\_D foi purificado utilizando *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), seguindo recomendações do fabricante e sequenciados através do método Sanger utilizando o equipamento ABI3500 na WEMSeq Biotecnologia. As sequências obtidas de MAYV\_D foram comparadas com o banco de dados GenBank usando a ferramenta *Blast* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).



### 5.3. TITULAÇÃO VIRAL POR FORMAÇÃO DE PLACA

Para avaliar a quantidade de partículas virais viáveis utilizamos o ensaio de titulação por formação de placa. Consiste em infectar células C6/36 ( $1 \times 10^5$  células por poço) com várias diluições seriadas (1:10) do material a ser utilizado (estoque viral ou sobrenadante celular infectado). Após as diluições, é inoculado 0,4 ml em cada poço e incubado por 1 h a 28 °C. Ao findar o tempo de incubação, o tapete celular é lavado com PBS e adicionado meio de cultivo semi-sólido (mistura 1:1 de 3,2% CMC e meio de cultivo L-15 acrescido de SBF e antibiótico) para incubação a 28 °C por 7 dias. Após esse período inicia-se a revelação, retirando o meio semissólido, lavando 3 vezes com PBS, fixando o tapete celular com 0,5 ml de paraformoldeído à 3% e corando-o com cristal violeta à 2%. Após a retirada do corante e lavagem abundante com água, as placas formadas foram contadas e o título viral, em pfu/ml, foi obtido utilizando:

$$T = P \times I \times D$$

Onde P é a quantidade de placas contadas; I o volume do inóculo em ml; e D corresponde a diluição onde foi realizada a quantificação das placas.

### 5.4. PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE TRIAGEM DE ANTIVIRAIS ANTI-MAYV

A permissividade de MAYV\_D nas linhagens C6/36, Vero E6, A549, Huh-7.5, A172 e SH-SY5Y e Macrófagos derivados de THP-1 foi avaliado através de IFI em *iHTS* utilizando  $1 \times 10^4$  células/poço semeadas em placas de 96 poços. As células foram infectadas com MOI de 0,1, 1 e 10 de MAYV\_D e incubadas por diferentes tempos (24h, 48h ou 72h). Após cada tempo de incubação, as placas foram fixadas, marcadas e analisadas através do ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI). Núcleos celulares e porcentagem de infecção de MAYV\_D foram avaliadas através da marcação com DAPI e mAb 1G1 seguido anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488, respectivamente (ver protocolo de IFI no item 5.5).

Para a linhagem THP-1 foi utilizado citometria de fluxo (ver protocolo de citometria de fluxo no item 5.6) para avaliação da permissividade utilizando  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços utilizando as mesmas condições de infecção supracitadas (24h, 48h e 72h).

Determinamos que, a linhagem celular base do nosso teste de triagem deve ser aquela com maior relevância biológica, tanto em ser permissiva ao vírus, tanto como ser sensível a alterações citotóxicas dos compostos. Assim, iniciamos a padronização da

infecção das células Huh-7.5 com MAYV para *iHTS*. 1 e  $2 \times 10^4$  células/poço foram semeadas em placas de 96 poços e infectadas com diferentes MOIs (0,02, 0,1, 0,5, 2,5, 12,5) de MAYV e incubadas 24 e 48 h. Após cada tempo de incubação, as placas foram fixadas, marcadas e analisadas através do ensaio de IFI (item 5.5). Assim, definimos o MOI de 0,5 por 24h a melhor condição de infecção. Entretanto, a concentração celular no poço foi determinada através do ensaio de confiabilidade estatística.

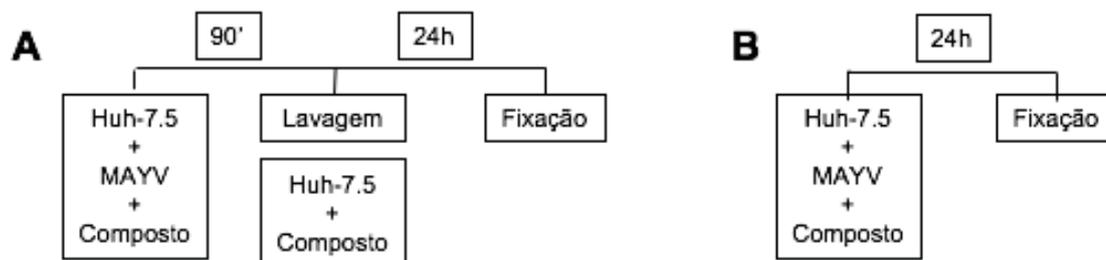
Através dos resultados obtidos, 3 experimentos independentes de confiabilidade estatística foram realizados para então verificar a homogeneidade da porcentagem de infecção viral em duas concentrações de células por poço diferentes. Esse ensaio consiste em utilizar placas de 96 poços previamente semeadas com 1 ou  $2 \times 10^4$  células/poço e dividi-las em MOCK (sem infecção; negativo) e MAYV (infectado com a melhor condição; positivo). Para determinar o valor de confiabilidade, foi utilizado o cálculo do Z score que é definido pela equação:

$$Z = \frac{[(3 \times \sigma p) + (3 \times \sigma n)]}{|\mu p - \mu n|}$$

Onde  $\sigma$  é o desvio padrão e  $\mu$  é a média da porcentagem de infecção dos poços positivos (p) e dos negativos (n).

Utilizando as condições de infecção padronizadas para os testes de triagem ( $2 \times 10^4$  células Huh7.5 infectadas com MOI 0,5 por 24 h), determinamos a concentração de uso da ribavirina e do IFN- $\alpha$  2a para, assim, serem empregados como controles *in vitro* de atividade anti-MAYV. Para isso, diferentes concentrações de cada composto (40 – 1,25  $\mu$ M e 4000 – 31,25 UI/ml para ribavirina e IFN- $\alpha$  2a, respectivamente) foram incubadas com MAYV MOI 0,5 por 24 h. Prosseguiu-se com a IFI e aquisição dos dados de quantificação nuclear e porcentagem de infecção.

Com o sistema de triagem padronizado, avaliamos duas metodologias de infecção (técnica clássica em virologia e a técnica utilizada em triagem de compostos em grande escala por sistema *iHTS*), descritas na figura 1. A diferença entre os métodos é a retirada ou não do inóculo viral após a incubação da infecção. Para tal teste, comparamos o desempenho de 2 compostos em diferentes concentrações (200, 100 e 50  $\mu$ M) e analisamos por IFI (protocolo do item 5.5). Valores de quantificação nuclear e porcentagem de infecção, tanto absolutos como normalizados, juntamente com seus desvios padrões, foram analisados para determinar a metodologia que foi utilizada para o sistema de triagem.



**Figura 1:** Metodologias de infecção de Huh-7.5 com MAYV para triagem de compostos em *iHTS*. As células previamente semeadas foram, em A, infectadas utilizando a metodologia clássica de virologia que consiste em adicionar o inoculo viral (MAYV MOI 0,5) juntamente com o composto diluído em meio de cultivo sem SBF, incubar por 90 minutos, lavar 3 vezes com PBS, adicionar o composto diluído em meio de cultivo com SBF e fixar após 24 h. Em B, está representada a metodologia utilizada em triagem de compostos por *iHTS*, onde o MAYV e o composto são diluídos em meio de cultivo com SBF, incubados com as células por 24 h e então fixados. Após a fixação de ambas metodologias, a IFI foi realizada e analisada como já descrita.

### 5.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) PARA *iHTS*

Os ensaios de IFI foram realizados em formato de placas de 96 cavidades, tendo  $2 \times 10^4$  células semeadas por poço de Huh-7.5. Estas células foram infectadas com MAYV\_D MOI 0,5, na presença ou ausência dos compostos em teste. 24 horas pós infecção (24 h.p.i.), cada poço em teste é fixado com 200  $\mu$ L/poço de metanol-acetona (1:1) e incubadas à  $-20^\circ\text{C}$  por 1 hora. 100  $\mu$ L/poço do mAb 1G1 (monoclonal desenvolvido utilizando a proteína E2 de CHIKV que reconhece cruzadamente outros alfavírus artritogênicos, como o MAYV) diluído 1:100 em PBS-BSA1% (solução salina fosfatada tamponada com 1% albumina sérica bovina) foi incubado por 1 hora à  $37^\circ\text{C}$ . Após três lavagens com PBS-T (solução salina fosfatada tamponada com 0,05% de Tween 20), anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Alexa 488; Sigma-Aldrich) e DAPI (4'.6-diamidino-2-phenylindole) foram diluídos 1:1000 e 0,3 mM, respectivamente, em PBS-BSA 1% e incubados por 1 hora à  $37^\circ\text{C}$ , seguido por três lavagens e adição de PBS (solução salina fosfatada tamponada). As imagens foram capturadas com o equipamento *Operetta CLS High-Content Analysis System* (PerkinElmer, Massachusetts, EUA) utilizando 8 campos na objetiva de 20x não confocal e analisadas através do *Harmony High Content Imaging and Analysis Software* (PerkinElmer). Quantificação de núcleos e porcentagem de infecção de MAYV\_D foram avaliadas através da marcação com DAPI e Alexa Fluor 488, respectivamente.

## 5.6. CITOMETRIA DE FLUXO

Após o tempo de incubação após a infecção de MAYV (24h ou 48h), as células foram recuperadas por centrifugação (2500 rpm por 5 min), bloqueadas com 200  $\mu$ L/poço de tampão bloqueio (PBS + 5% SBF + 1% soro humano) por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram centrifugadas e fixadas com 100  $\mu$ L de *Citofix/Citoperm* (BD Biosciences, USA) por 20 min em TA. Após nova centrifugação seguiram-se três lavagens com solução de Perm/Wash (200  $\mu$ L/poço) e incubação com o anticorpo mAb 1G1 (diluído 1:100 em Perm/Wash – BD Biosciences) por 30 minutos à 37 °C. Lavou-se três vezes com Perm/Wash e incubou-se com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 diluído 1:400 em Perm/Wash nas mesmas condições anteriores. Ao fim, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e recuperadas em 200 $\mu$ L/poço de PBS para análise imediata por citometria de flux. A quantificação das células infectadas foi realizada no equipamento BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA) e os dados de porcentagem de infecção analisados com o software FlowJo versão 10.

## 5.7. TRIAGEM DE COMPOSTOS ANTIVIRAIS ANTI-MAYV

Após a padronização da metodologia de *iHTS*, os flavonóides, carbamatos e os compostos da biblioteca aprovada pela FDA foram triados em diferentes concentrações (200, 100 e 50  $\mu$ M) frente a infecção de MAYV\_D. Como controles de atividade antiviral do teste, utilizamos os compostos ribavirina (20  $\mu$ M) e IFN- $\alpha$  2A (1000 UI/ml). Tanto os compostos em teste, bem como os controles, de forma individual, foram acrescentados ao inóculo de MAYV\_D MOI 0,5. Assim, cada mistura (composto + vírus) foi incubada em  $2 \times 10^4$  células/poço de Huh-7.5 semeadas em placas de 96 poços. 24 h.p.i., as placas foram fixadas e prosseguiu-se com a IFI, captura e análise da infecção e quantificação nuclear das diluições testada para cada composto (conforme item 5.5).

O primeiro critério utilizado para a seleção dos compostos candidatos com atividade anti-MAYV foi através de gráfico de dispersão dos resultados normalizados. As concentrações que apresentaram mais de 80% de redução da porcentagem normalizada de infecção viral e 80% de viabilidade celular normalizada por quantificação de núcleos foram selecionadas para o próximo teste. Para aqueles compostos que obtiveram resultados dentro dos limites estabelecidos acima foi determinado o índice de seletividade (IS), através do ensaio curva dose-resposta. O ensaio se baseia em avaliar 8 diferentes concentrações de cada composto (800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 e 6.25  $\mu$ M) por meio da porcentagem normalizada dos valores de quantificação nuclear e infecção, sendo o índice de seletividade (IS) definido por:

$$IS = \frac{CC50}{IC50}$$

Onde o CC50 é a concentração citotóxica para 50% das células calculado a partir dos dados normalizados da quantificação nuclear do controle MOCK e IC50 é a concentração inibitória de 50% da infecção viral calculado a partir dos dados normalizados da porcentagem de células infectadas do controle MAYV\_D. A partir dos valores de IS, determinamos os compostos candidatos com atividade anti-MAYV mais promissores. Para cada classe de composto (flavonas, flavononas, carbamatos e biblioteca FDA) foram selecionados no máximo dois compostos dos quais possuíram os maiores IS. Tais compostos selecionados passaram por teste confirmatório visual da imagem adquirida a fim de confirmar a normalidade da morfologia nuclear, via marcação de DAPI. Ao fim dessas avaliações dos critérios por nós definidos, obtivemos 4 compostos promissores anti-MAYV: naringenina, LLA9A, crisina e éster C6.

## 5.8. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÁXIMA NÃO TÓXICA DOS COMPOSTOS

### CANDIDATOS ANTI-MAYV

Um total de  $2 \times 10^4$  células/poço de Huh-7.5 foram tratadas durante 24 h com 6 diferentes concentrações (400, 200, 100, 50, 25 e 12.5  $\mu\text{M}$ ) de cada composto candidato anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6). Ao término do período de tratamento, cada poço foi fixado com 200  $\mu\text{l}$  de metanol-acetona (1:1) por 1h à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . O fixador foi descartado e as células marcadas com DAPI (0,3mM) diluído em PBS-BSA1% por 1h à  $37\text{ }^\circ\text{C}$  e a captura das imagens foram nas mesmas condições descritas para a IFI. A análise consistiu em determinar e discriminar, através da intensidade da marcação nuclear, as células saudáveis daquelas em processo de morte celular. Para isso, determinamos um ponto de corte, através da intensidade média de marcação nuclear das células não tratadas. Assim, utilizou a seguinte equação:

$$IMV = IMN + (3 \times \sigma_{nt})$$

Onde IMV é o ponto de corte da intensidade da marcação nuclear com DAPI definido pela intensidade média do controle não tratado (IMN) adicionado três vezes o seu desvio padrão ( $\sigma_{nt}$ ). Assim, os valores da intensidade de cada célula que estiver acima do IMV foram considerados não viáveis.

A partir desse valor, obtivemos a porcentagem de células, na área analisada, consideradas não viáveis e, com isso, normalizamos os dados calculando a porcentagem de viabilidade para cada concentração através da equação:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{(X - cnt)}{(cpt - cnt)}$$

Onde X é a porcentagem de células não viáveis da condição avaliada e os controles (c) são a porcentagem de células não viáveis nos poços não tratados (nt) e tratados com DMSO 20% (pt). A maior concentração de cada composto analisado que possui valor maior que 80% de viabilidade e 80% de quantificação nuclear foi definido como a DMNT.

Com o objetivo de confirmar a DMNT realizamos o ensaio de morte celular utilizando os marcadores *Annexin-V* (FITC) e *7-AAD* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para marcação celular. Assim, Huh7.5 ( $1 \times 10^5$  células por poço em placas com 24 cavidades) foram tratadas por 24h com 6 concentrações de cada composto candidato (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6), que variou de acordo com o resultado obtido no ensaio de DMNT através do sistema *iHTS*. Assim as doses testadas foram 3200, 1600, 800, 400, 200 e 100  $\mu\text{M}$  para naringenina, 800, 400, 200, 100, 50 e 25  $\mu\text{M}$  para LLA9A, 400, 200, 100, 50, 25 e 12.5  $\mu\text{M}$  para crisina e éster C6. Como controle de morte celular utilizamos temperatura, expondo as células à 56 °C por 30 minutos. Após a incubação, as células foram tripsinizadas, marcadas com *Annexin-V* (FITC) e *7-AAD*, conforme orientações do fabricante. Os dados foram coletados utilizando citometria de fluxo (FACS Canto II; BD Biosciences, São Jose, CA, USA) e analisados no software FlowJo. As células consideradas como viáveis foram aquelas que, ao analisadas, mostraram-se duplo negativa para ambos os marcadores.

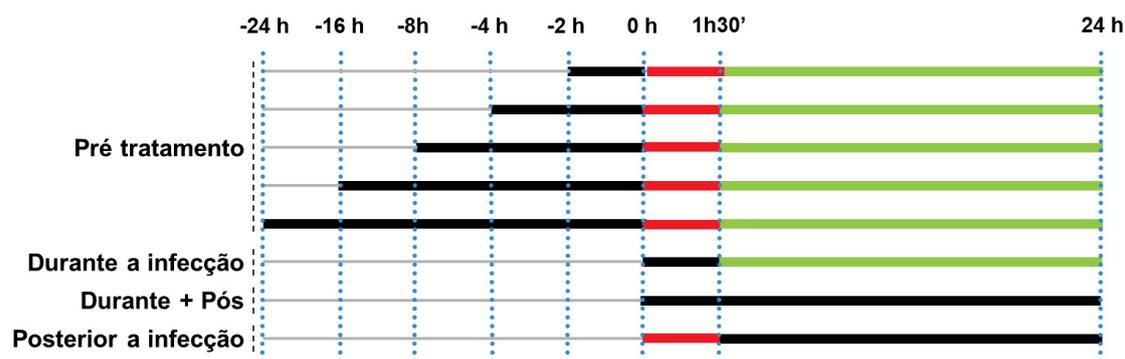
### 5.9. ENSAIO VIRUCIDA

Em um microtubo foram incubados à 37 °C um mix contendo  $2 \times 10^5$  pfu/ml de MAYV\_D e a DMNT de cada composto candidato anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6), em um volume final de 100  $\mu\text{l}$ . Ao passar 1 h, prosseguimos o ensaio virucida dos compostos por meio do ensaio de titulação por formação de placas (ver item 5.3), conforme descrito previamente (FERRAZ *et al.*, 2019). Brevemente, a mistura (vírus + composto) foi diluído em meio de cultura e, diferentes diluições da mistura foram inoculadas em células C6/36.

### 5.10. ENSAIO DE TEMPO DE ADIÇÃO

No ensaio de triagem de compostos anti-MAYV as substâncias candidatas (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6) foram avaliadas quanto o efeito tanto na entrada quanto durante a replicação viral (composto adicionado durante e após a

infecção). Visando melhor determinar o momento em que os compostos atuam realizamos o ensaio de tempo diferencial de adição dos compostos na infecção. Assim, em placas de 96 poços semeadas previamente com  $2 \times 10^4$  células Huh-7.5 adicionamos as substâncias em diferentes tempos para determinar em qual momento ocorre a atividade antiviral (pré tratamento, durante infecção, durante/pós, pós infecção), conforme esquematizado na figura 2. O pré tratamento consistiu em expor as células à DMNT de cada substância por diferentes tempos (2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h) antes de infectá-las (no tempo 0 h) e, após essa incubação, as células foram mantidas em meio de cultivo por 24 h. No tratamento durante infecção a DMNT de cada composto foi adicionado ao mesmo tempo que o inoculo viral (0 h), dos quais ficaram em contato com as células pelo mesmo período (1h30'), lavadas e adicionado meio de cultivo, sem o composto, seguido por 24h de incubação. Já no tratamento pós infecção, após ocorrer a infecção viral (sem a presença do composto), o inóculo viral foi retirado das células (tempo 1h30'), o tapete celular lavado e a DMNT de cada composto candidato foi adicionada e incubadas durante 24 h em meio fresco. A infecção durante/pós infecção foi utilizado como controle do experimento, pois mimetiza o ensaio de triagem em que selecionamos os compostos mais promissores. Em todas as formas de tratamento a infecção foi realizada utilizando MAYV\_D MOI 0,5 durante 1h30' e, após decorridas 24 h.p.i., as células foram fixadas e prosseguiu-se com a IFI.



**Figura 2:** Metodologia utilizada no ensaio de tempo de adição dos compostos candidatos anti-MAYV. Cada linha, representada na figura acima, demonstra um tratamento diferente. O pré tratamento consiste em adicionar os compostos e incubá-los por 2 h, 4 h, 8 h, 16 h e 24 h antes da infecção; tratamento durante infecção consiste em submeter as células aos compostos apenas durante a infecção (tempo 1h30'); o tratamento pós infecção consiste em adicionar o composto apenas após a retirada do inóculo viral (tempo 1h30') e incubado por 24h; e o durante/pós representa a união dos tratamentos durante infecção e pós infecção. Linha em cor cinza corresponde o tempo pós semeadura das células na placa, cor preta o período de tratamento, cor vermelha a infecção sem tratamento e na cor verde o meio de cultivo adicionado sem tratamento. Em todos os tratamentos, a infecção ocorreu no tempo 0 h e permaneceu até o tempo de 1h30'.

### 5.11. ENSAIO DE ADSORÇÃO VIRAL

A avaliação da capacidade dos compostos candidatos anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6) de interagir na adsorção viral foi definida utilizando placas de 96 cavidades previamente semeadas com  $2 \times 10^4$  células Huh-7.5 por poço. Inoculamos MAYV\_D MOI 0,5 conjuntamente com a DMNT das substâncias pertencentes ao hit anti-MAYV e incubamos por 1h30' à 4 °C. Decorrida a incubação, o tapete foi lavado, adicionamos meio de cultivo e, após 24 h.p.i. à 37 °C, fixamos com metanol-acetona e prosseguimos com a IFI conforme descrito no subitem 5.5. O sobrenadante foi submetido a titulação conforme descrito no subitem 5.3.

### 5.12. ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO VIRAL

O ensaio de internalização viral consiste em infectar com MAYV\_D MOI 0,5 as células Huh-7.5 previamente semeadas em placas de 96 cavidades por 1:30h à 4 °C. Passada a incubação, adicionamos cada composto candidato anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6) na DMNT e incubamos por 1:30 h à 37 °C. Após essa segunda incubação, lavamos o tapete celular com PBS e tratamos com tampão citrato

(40 mM ácido cítrico, 10 mM de cloreto de potássio, 135 mM de cloreto de sódio, pH 3) por 1 minuto. Novamente lavamos e meio de cultivo foi adicionado, incubamos por 24 h à 37 °C, fixamos com metanol-acetona e prosseguimos com a IFI conforme descrito no subitem 5.5. O sobrenadante foi submetido a titulação conforme descrito no subitem 5.3.

### **5.13. TESTE DE EFICÁCIA ANTIVIRAL EM INFECÇÃO ESTABELECEIA**

Este teste consiste em infectar  $2 \times 10^4$  células Huh-7.5 com MAYV\_D MOI 0,5 durante 1h30'. Após esse período, o inóculo foi retirado, as células lavadas com PBS e, em diferentes tempos pós-infecção (0h, 2h, 4h e 6h), foi adicionado os compostos candidatos anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6) nas suas DMNT, conforme figura 14A. Ao se passar 24hpi e lavagem, as células foram então fixadas com metanol-acetona e prosseguiu-se com a IFI conforme descrito no subitem 5.5. O sobrenadante foi submetido a titulação conforme descrito no subitem 5.3.

### **5.14. TESTE DE EFICÁCIA ANTIVIRAL EM OUTRAS LINHAGENS HUMANAS**

A fim de verificar se os compostos candidatos anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6) podem atuar de forma independente do tipo celular, analisamos a ação destes em outras linhagens de células humana, a A549 (células de adenocarcinoma humano do epitélio alveolar basal) e a SH-SY5Y (células de neuroblastoma humano). Com isso, determinamos como melhor condição de infecção MOI 1 por 24h para ambas linhagens. Assim,  $2 \times 10^4$  células A549 e SH-SY5Y foram adicionadas em cada poço de placas com 96 cavidades e infectadas com MAYV\_D conforme determinado acima. Após 1h30', as células foram lavadas com PBS e adicionado meio de cultivo contendo cada composto candidato anti-MAYV na DMNT. Após 24 h.p.i. à 37°C, fixou-se o tapete celular com metanol-acetona e prosseguiu-se com a IFI conforme descrito no subitem 5.5. O sobrenadante foi submetido a titulação conforme descrito no subitem 5.3.

### **5.15. TESTE DE EFICÁCIA ANTIVIRAL EM DIFERENTES CEPAS DE MAYV**

Para verificar se a ação de cada composto candidato anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6) é cepa dependente, utilizamos cepas de genótipos diferentes de MAYV para este ensaio. Para isso, padronizamos a infecção da cepa BeAr 20290 (Figura 16A) em células Huh-7.5, utilizando diferentes MOIs (12,5, 2,5, 0,5, 0,1 e 0,002) e tempos de infecção (24hpi e 48hpi). Definimos que a melhor condição de infecção não

deveria saturar o sistema, ou seja, a porcentagem de células infectadas deve estar aproximadamente em 60%. Assim, determinamos MOI de 0,1 por 24h.

Com a padronização da infecção de ambas as cepas finalizada, demos prosseguimos o teste de eficácia antiviral, utilizamos apenas o tratamento pós a infecção (figura 1A). Assim,  $2 \times 10^4$  células Huh-7.5 em placas de 96 cavidades foram infectadas com as cepas MAYV\_D ou BeAr20290 com MOI 0,5 e 0,1, respectivamente. Após 1h30min à 37°C, as células foram lavadas com PBS e adicionamos a DMNT dos compostos candidatos anti-MAYV. Ao fim das 24h de incubação à 37°C, fixou-se as células com metanol-acetona e prosseguiu-se com a IFI conforme descrito no subitem 5.5. O sobrenadante foi submetido a titulação conforme descrito no subitem 5.3.

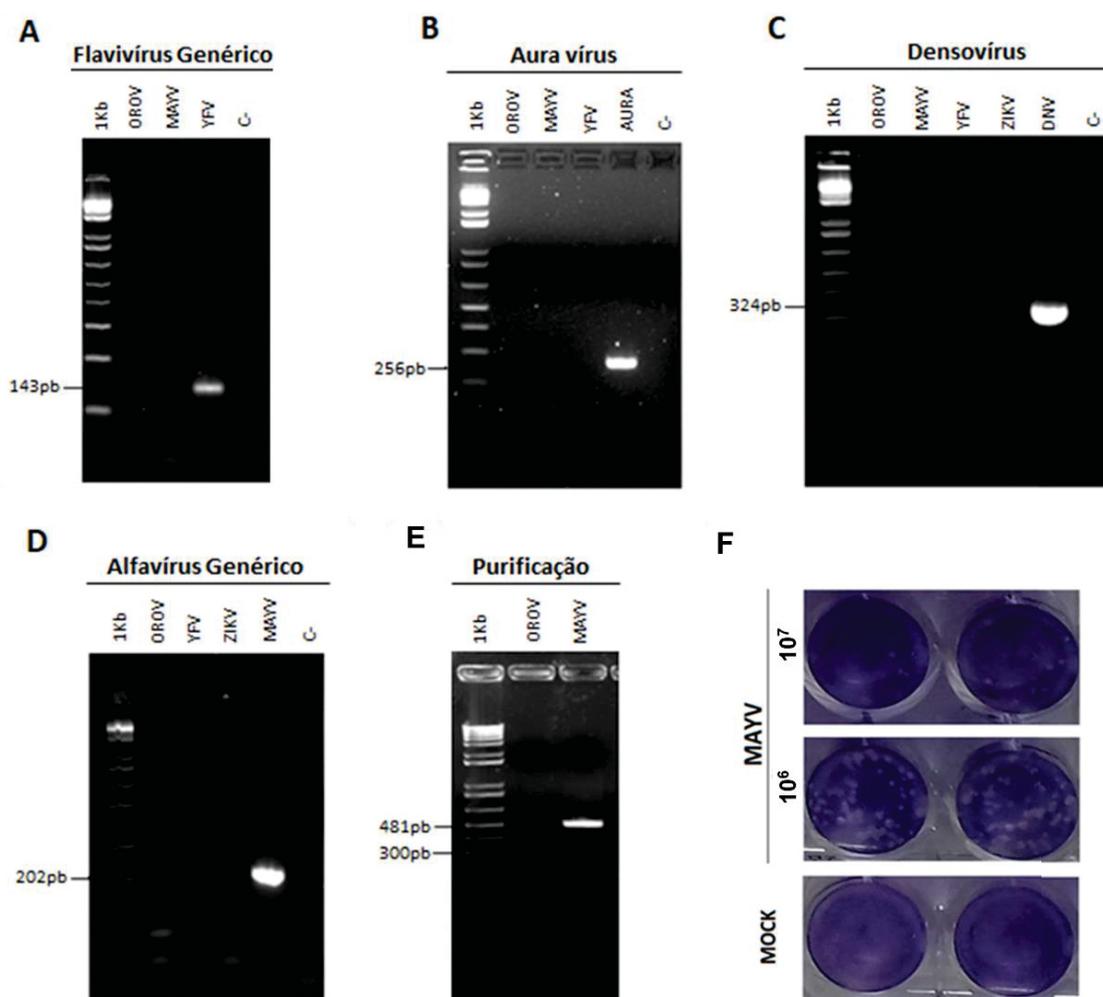
### **5.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para cálculos de CC50 e IC50 foi utilizado análise de regressão não linear seguido do teste de inclinação variável.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 VALIDAÇÃO E CERTIFICAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL MAYV-D

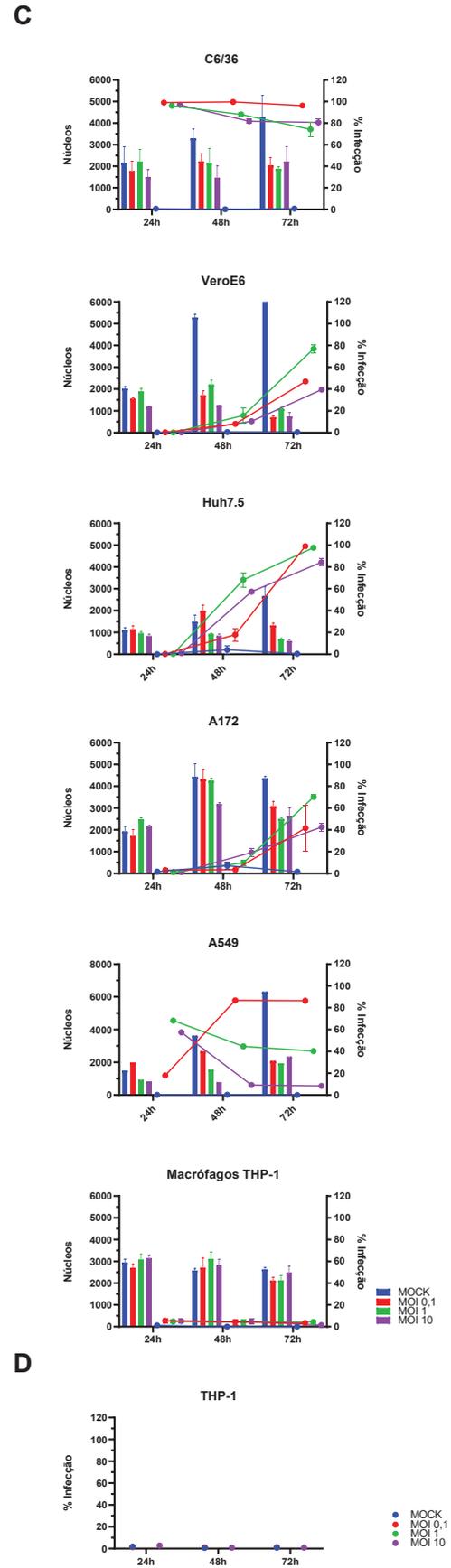
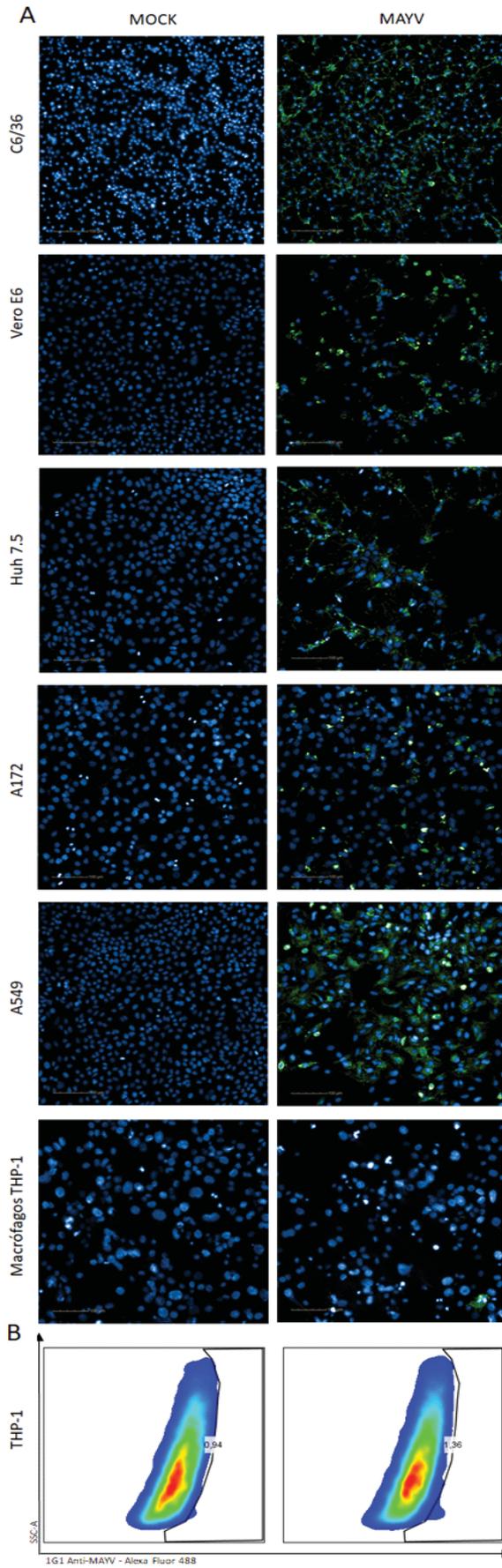
Antes de amplificar o estoque viral de MAYV\_D foi realizada uma verificação para possíveis vírus contaminantes e certificar a identidade da cepa de MAYV, conforme a tabela 2. O ensaio de RT-PCR realizada a partir do RNA do estoque de MAYV\_D para o gênero flavivirus (figura 3A) e, para os vírus específicos de células de mosquitos, aura (Figura 3B) e densovirus vírus (Figura 3C), foram negativos. Em relação ao resultado com iniciadores do gênero alfavírus, o estoque de MAYV foi positivo (Figura 3 D). Após a amplificação, o amplicon gerado pela RT-PCR com os iniciadores Alpha 1+ e 1- foi purificado para a realização de sequenciamento nucleotídico (Figura 3E). O fragmento de 453 pares de bases (pb) obtido através de amplificação demonstrou que se trata de uma cepa genótipo D com 99% de identidade e cobertura com a cepa TRVL 15537 (KP842810.1). Assim, o estoque viral de MAYV\_D foi amplificado e titulado em C6/36. Esse lote apresenta título de  $1.9 \times 10^8$  pfu<sub>C6/36</sub>/ml (Figura 3F).



**Figura 3:** Amplificações da RT-PCR para validação do estoque viral de MAYV\_D. Utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das amostras de MAYV\_D, demonstra-se os produtos amplificados a partir dos iniciadores Flavi 2+ e 2- (A), AURAV 5F e 6R (B), DNV 3F e 3R (C), Pan alpha F2e R2 (D), descritos na tabela 1. Em E, os produtos purificados das amplificações com os iniciadores Alpha 1+ e 1-. C-: controle negativo da reação utilizando água; 1Kb: marcador de peso molecular. Géis de agarose em 1% corados com brometo de etídeo. Em F, a metodologia de titulação por formação de placa em células C6/36 foi empregada para titulação do estoque da cepa de MAYV\_D. As diluições iniciaram em  $10^{-1}$  até  $10^{-10}$ , entretanto demonstramos apenas os poços utilizados para o cálculo de título viral ( $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ). MOCK: controle negativo do ensaio de titulação. Cristal Violeta foi utilizado para coloração.

## **6.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE TRIAGEM ANTIVIRAL PARA MAYV EM IHTS**

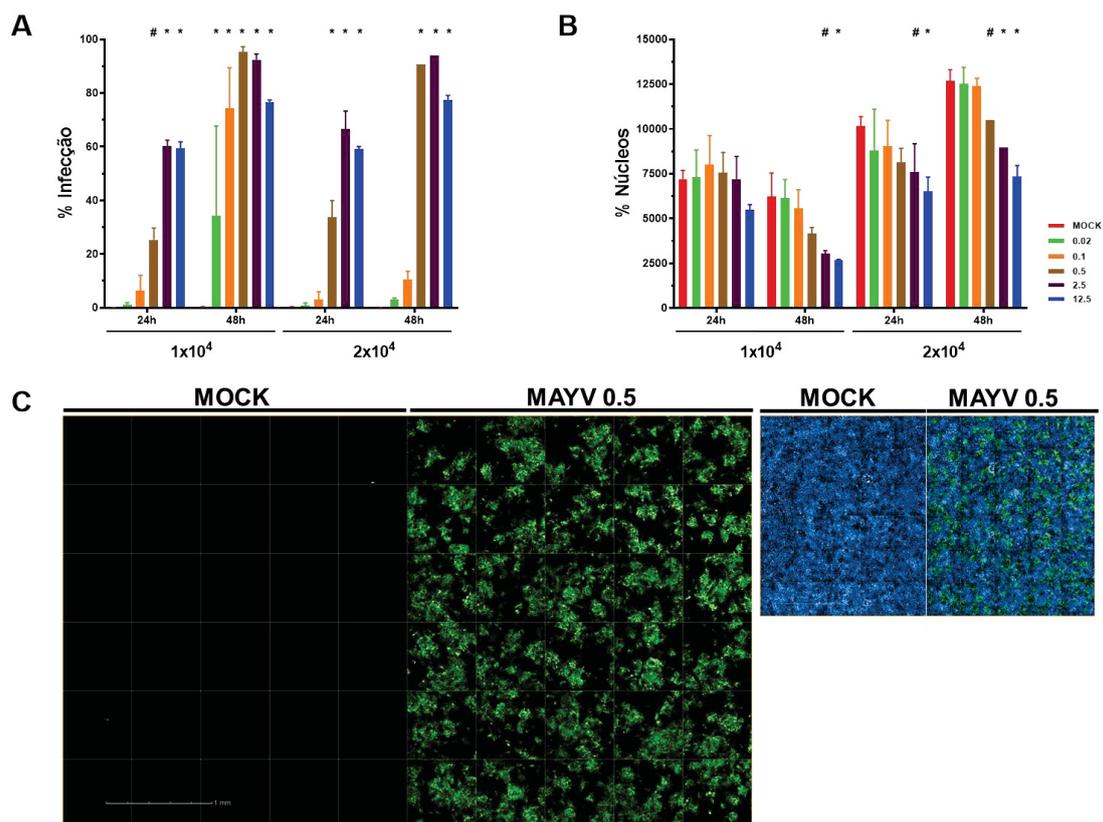
As linhagens celulares C6/36, Vero E6, Huh-7.5, A172 e A549 foram permissivas a infecção por MAYV\_D (Figura 4A) e apresentaram infecção produtiva (Figura 4C), com diminuição na quantidade de núcleos da cultura de células infectadas quando comparadas ao MOCK (Figura 4C). A linhagem THP-1 (Figura 4B-C) e de macrófagos diferenciados de THP-1 foram refratárias à infecção (Figura 4A-C).



**Figura 4:** Permissividade celular de diferentes linhagens celulares para o MAYV\_D. É demonstrado, em A, a imagem representativa da permissividade ao MAYV\_D (MOI 0,1) de culturas de C6/36, Vero E6, Huh-7.5, A172, A549 e macrófagos diferenciados de THP-1, por IFI após 72h de infecção. A THP-1, representada em B, foi avaliada através de citometria de fluxo (MOI 0,1; 72h de infecção). Dados de infecção (C) e número de núcleos por poço para cada linhagem (exceto para THP-1; D) são demonstrados para cada MOI testado (0,1, 1 e 10) e tempo pós infecção (24, 48 e 72 h.p.i.). São demonstrados os dados de três réplicas biológicas em triplicata técnica. Em azul, núcleos corados com DAPI e, em verde, MAYV\_D marcado com mAb1G1 seguido de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. MOCK: células não infectadas após 72 h.p.i.; MAYV: células infectadas com MAYV MOI 0,1 e 72 h.p.i. Barras correspondem a quantificação nuclear e as linhas correspondem à porcentagem de células infectadas; azul: MOCK; Vermelho: MOI 0,1; verde: MOI 1; lilás: MOI 10. Barra na imagem MOCK C6/36 corresponde ao valor de referência de 100  $\mu\text{m}$ .

Escolhemos a linhagem Huh-7.5 para ser a célula base do nosso teste de triagem, pois, além de ser permissiva ao MAYV, ela é relevante biologicamente no metabolismo dos compostos. Diferentes parâmetros foram analisados para a padronização do ensaio de *iHTS* visando a triagem de compostos anti-MAYV, como: quantidades de células Huh-7.5 (1 e  $2 \times 10^4$  células/poço); MOIs (12,5, 2,5, 0,5, 0,1 e 0,02); e tempos de infecção (24 e 48 h.p.i.) (Figura 5A-B). As condições de infecção foram determinadas a partir do maior MOI e menor tempo de incubação em que não houve redução no número de núcleos contados, quando comparados com o MOCK (Figura 5B). Assim, o MOI 0,5 por 24h foi considerada a melhor condição de infecção, com média e desvio padrão de 25.31 %  $\pm$  4,4 e 33.7 %  $\pm$  6.3, para 1 e  $2 \times 10^4$  células/poço, respectivamente.

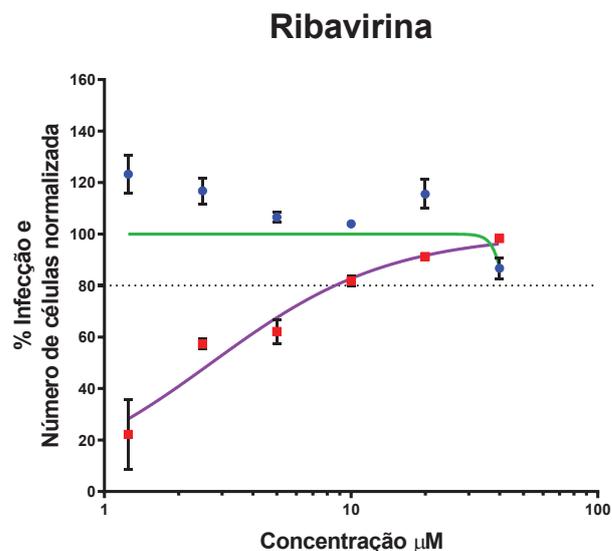
Ao calcular o valor médio de infecção e índice Z para ambas quantidades de células por meio do teste de confiabilidade estatística (Figura 5C), temos: 29,87% de células infectadas e Z score de 0,8304 para  $1 \times 10^4$  células/poço e 44.84% e Z score de 0,9044 para  $2 \times 10^4$  células/poço. Com isso,  $2 \times 10^4$  células/poço demonstrou melhor desempenho estatístico quando comparado à  $1 \times 10^4$  células/poço.



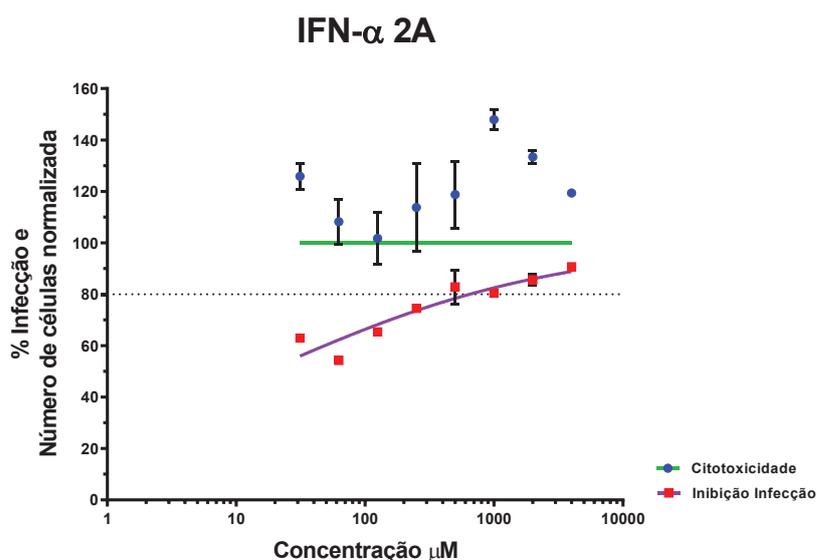
**Figura 5:** Padronização da infecção de Huh-7.5 com MAYV\_D para ensaio de triagem por *iHTS*. Duas quantidades diferentes de células (1 e  $2 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas e infectadas com MAYV\_D por tempos (24 e 48 h.p.i.) e MOIs (12,5, 2,5, 0,5, 0,1 e 0,02) diferentes. A porcentagem de células infectadas (A) e a quantificação nuclear (B) foram analisadas por IFI. Em C, mostramos o representativo do ensaio de confiabilidade estatística utilizando meia placa de 96 poços não infectada (MOCK) e meia placa infectada com as condições padronizadas de infecção de MAYV ( $2 \times 10^4$  células/poço, MOI 0,5 por 24h). Nos gráficos de barras A e B, em vermelho MOCK, verde MOI 0,02, laranja MOI 0,1, marrom MOI 0,5, roxo MOI 2,5, azul MOI 12,5. Nas imagens (C), em azul marcação nuclear com DAPI e em verde marcação de MAYV utilizando mAb 1G1 seguido de anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. A barra na imagem C, corresponde a 1mm. Os dados expressos correspondem a valores médios com os respectivos desvios padrão de três experimentos independentes em triplicata técnica. Diferença significativa representada por (\*) quando  $p < 0,001$  e (#) quando  $p < 0,05$  ao comparar o grupo não infectado (MOCK) correspondente, analisando os dados usando ANOVA seguido por teste de Tukey, de três réplicas biológicas em triplicata

Os compostos ribavirina (Figura 6A) e IFN- $\alpha$  2a (Figura 6B) foram testados em diferentes concentrações para determinar a dose de uso que inibe mais que 80% da infecção viral por MAYV\_D e tenha no mínimo 80% de viabilidade celular por quantificação nuclear. Assim, utilizaremos 20  $\mu$ M de ribavirina e 1000 UI/ml de IFN- $\alpha$  2a como controles positivos de atividade anti-MAYV durante todos os seguintes testes *in vitro*.

A



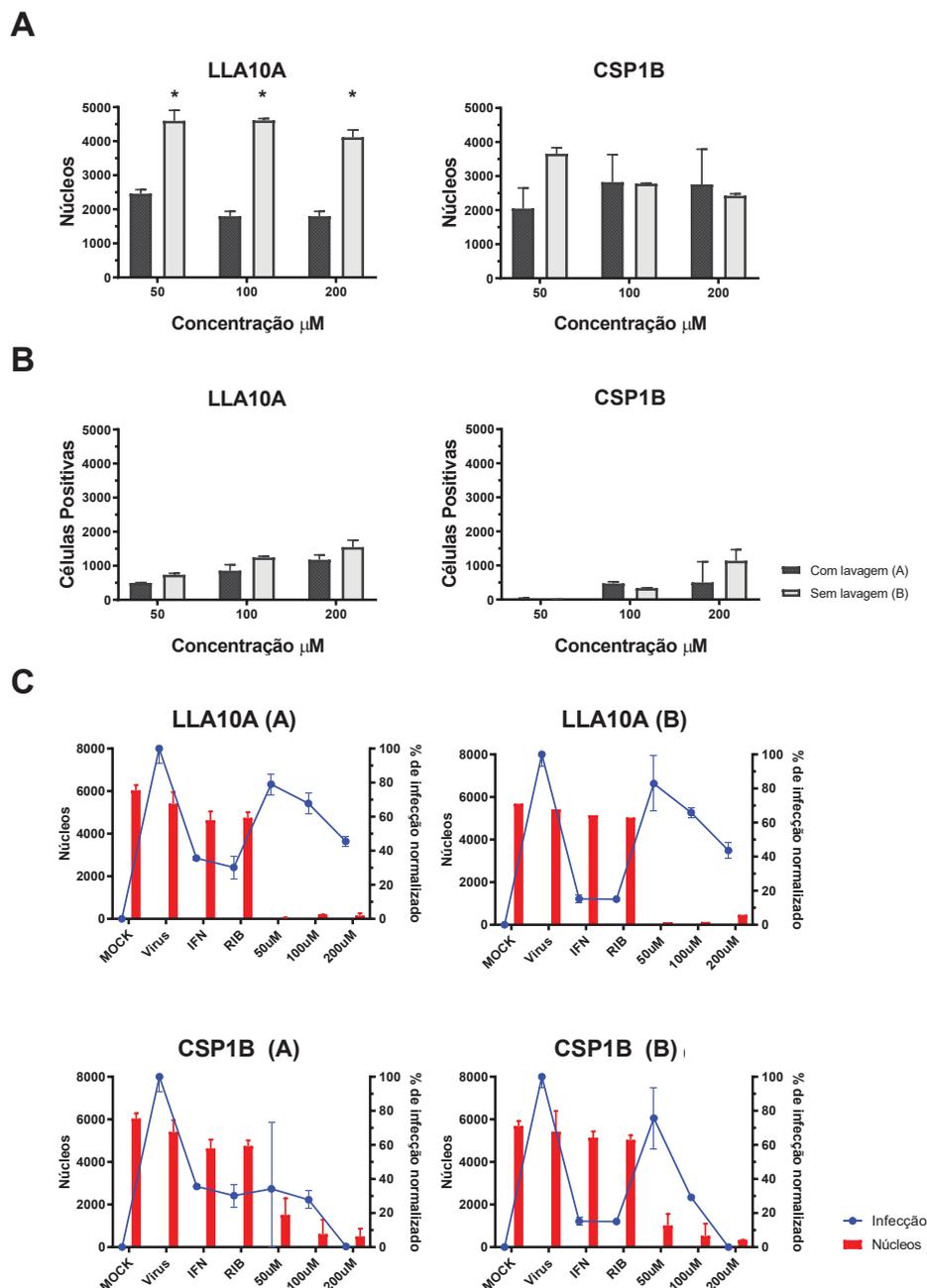
B



**Figura 6:** Determinação da concentração de uso dos controles de atividade anti-MAYV. Dois compostos, ribavirina (A) e IFN- $\alpha$  2A (B) foram diluídos serialmente (1:2) em meio de cultivo celular contendo MAYV\_D (MOI 0,5), incubados em células Huh-7.5 e fixados 24 h.p.i. Dados da porcentagem normalizada da quantificação nuclear (círculos azuis com linha verde) e da infecção (quadrados vermelhos com linha lilás) são mostrados em gráfico curva dose-resposta, de três experimentos independentes em triplicata técnica. Linha pontilhada representa a IC80.

Para finalizar a padronização do teste de triagem, comparamos duas metodologias diferentes de infecção: a classicamente utilizada em virologia (Figura 1A),

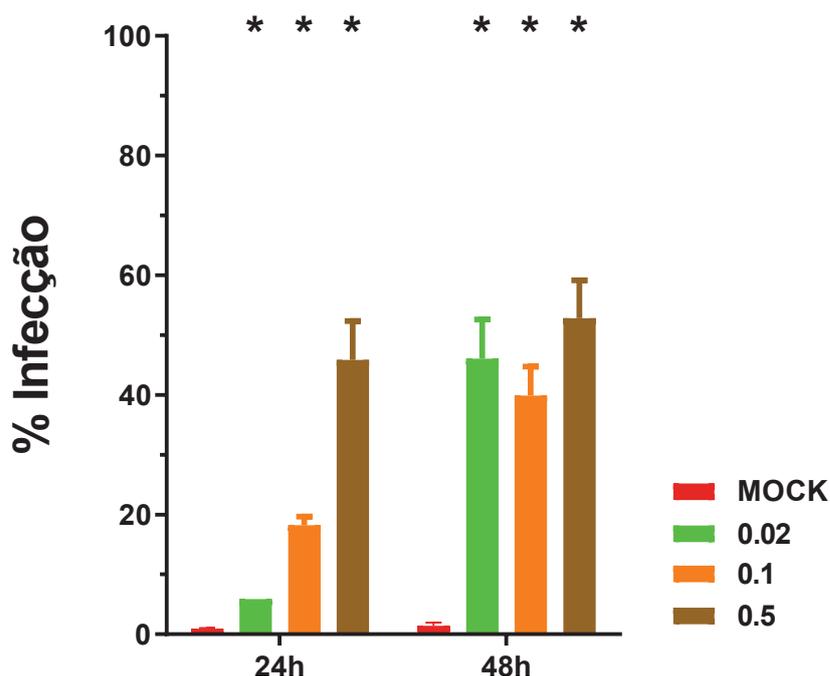
onde se retira o inóculo viral após a infecção; e a utilizada em triagem de compostos no modelo *iHTS* (Figura 1B), onde o inóculo viral é mantido durante todo o experimento com a posterior adição dos compostos. Ao se utilizar os dois compostos escolhidos aleatoriamente (LLA10A e CSP1B) em ambas metodologias, a B possuiu menor desvio padrão, principalmente, na concentração de 50  $\mu$ M com os dois compostos quando comparados com a metodologia A, tanto em números absolutos de núcleos (Figura 7A), como em contagem de células positivas (Figura 7B), além dos valores normalizados de quantificação nuclear (Figura 7C). Entretanto, ao analisar os controles de atividade antiviral, há diferença estatística entre a porcentagem de infecção (Figura 7C) onde B manteve a redução de 80% da infecção quando comparado com o controle MAYV.



**Figura 7:** Metodologias de infecção de Huh-7.5 com MAYV\_D para triagem de compostos em sistema *iHTS*. Utilizamos duas metodologias (descritas na Figura 1) em dois compostos diferentes, LLA10A e CSP1B e analisamos, após 24h da infecção os valores: núcleos absolutos (A), número absoluto de células positivas infectadas com MAYV\_D (B) (barras pretas – metodologia A; barras cinzas – metodologia B) e os dados normalizados da porcentagem da quantificação nuclear e infecção (C – barras e linhas, respectivamente). Os dados expressos correspondem a valores médios com os respectivos desvios padrão de três experimentos independentes em triplicata técnica. Diferença significativa representada por (\*) quando  $p < 0,001$  ao comparar a mesma concentração em metodologias diferentes, analisando os dados usando ANOVA *two way* seguido por teste de Tukey, de três réplicas biológicas em triplicata

### 6.3 PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO DE MAYV EM HUH-7.5 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Diferentes parâmetros foram analisados para a padronização da infecção de MAYV\_D em citometria de fluxo, como: MOIs (0,02, 0,1 e 0,5) e tempos de infecção (24 e 48 h.p.i.) (Figura 8). As condições de infecção foram determinadas a partir da comparação das porcentagens de infecção com aquelas obtidas no sistema *iHTS*. Assim, MOI 0,5 por 24h foi considerada a melhor condição de infecção de células Huh-7.5 para a citometria de fluxo apresentou média e desvio padrão de 45,8 %  $\pm$  6,5.



**Figura 8:** Padronização da infecção de Huh-7.5 com MAYV\_D para citometria de fluxo.  $2 \times 10^5$  células/poço foram infectadas com diferentes MOI (0,02, 0,1 e 0,5) de MAYV e incubadas por 24 e 48 h.p.i. Após fixadas, marcadas com mAb1G1 seguido de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488, os dados foram adquiridos e as porcentagens de infecção para cada condição foram analisadas. Em vermelho – MOCK, verde – MOI 0,02, laranja – MOI 0,1, marrom – MOI 0,5. Dados médios com seus respectivos desvios padrão de três experimentos independentes em triplicata técnica. Diferença significativa representada por (\*) quando  $p < 0,001$  ao comparar o grupo controle não infectado (MOCK) correspondente, analisando os dados usando ANOVA seguido por teste de Tukey, de três réplicas biológicas em triplicata

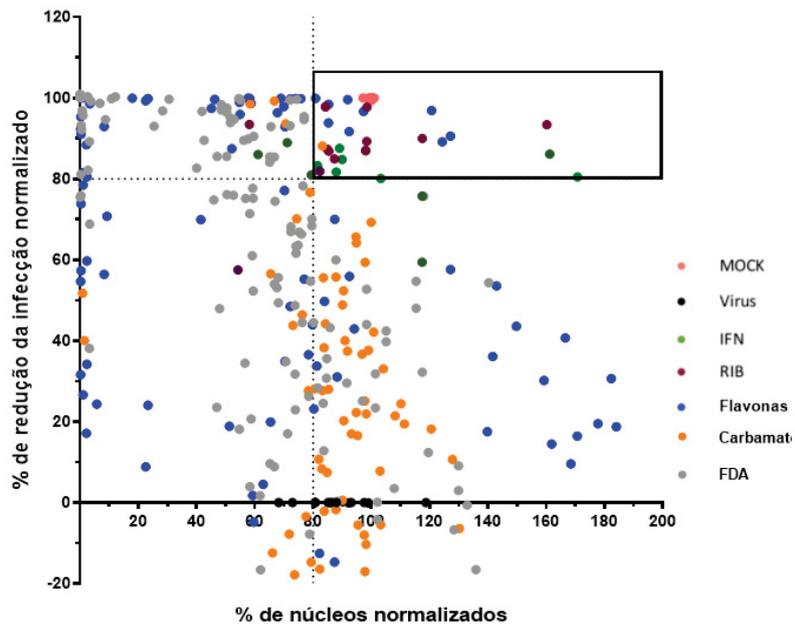
### 6.4 TRIAGEM DE COMPOSTOS ANTIVIRAIS ANTI-MAYV

Um total de 104 compostos, divididos em flavonoides (flavononas - naringenina e derivados,  $n=21$ ; flavonas - crisina e derivados,  $n=9$ ), carbamatos ( $n=22$ ) e biblioteca *Tocriscreen* ( $n=52$ ) foram testados quanto a sua atividade anti-MAYV. Destes, 7

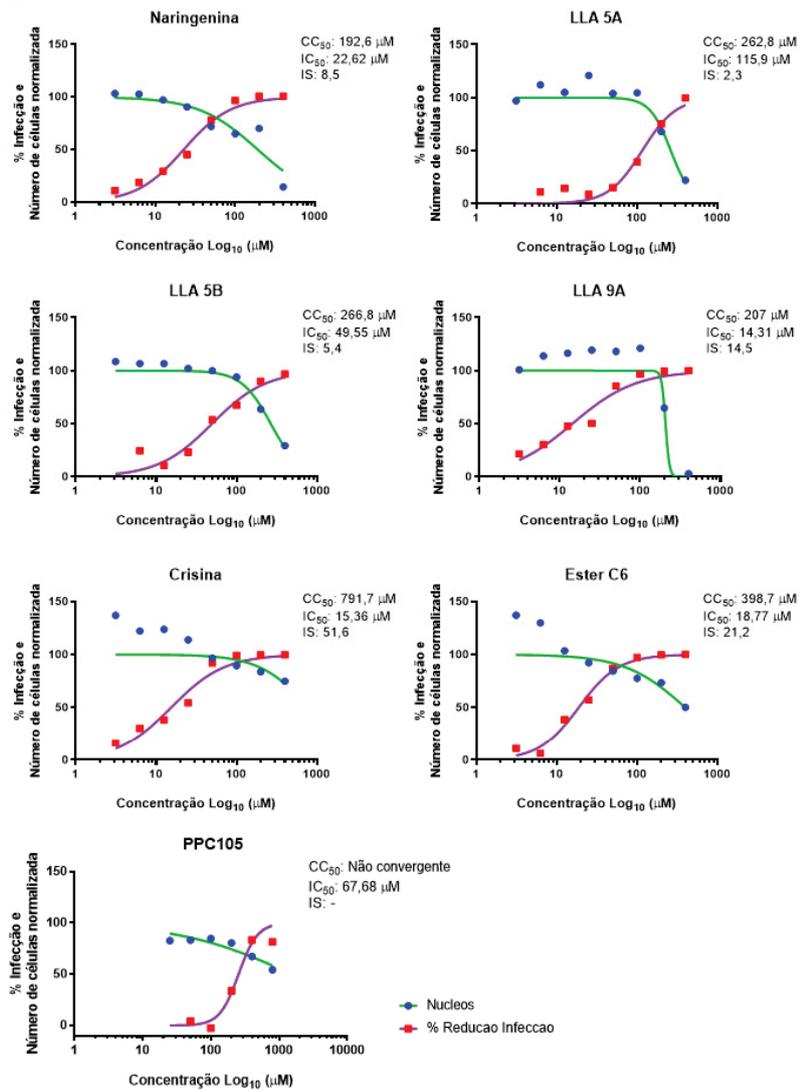
compostos, em diferentes concentrações, possuíram mais de 80% de redução de infecção mantendo a integridade de núcleos: naringenina, LLA5A, LLA5B, LLA9A, crisina, éster C6 e PPC105 (Figura 9A). Os compostos carbamatos apresentaram menor citotoxicidade quando comparados aos flavonoides, entretanto sem atividade anti-MAYV, exceto PPC105. Em relação aos compostos *Tocriscreen*, não houve resultados promissores em nenhum dos compostos testados.

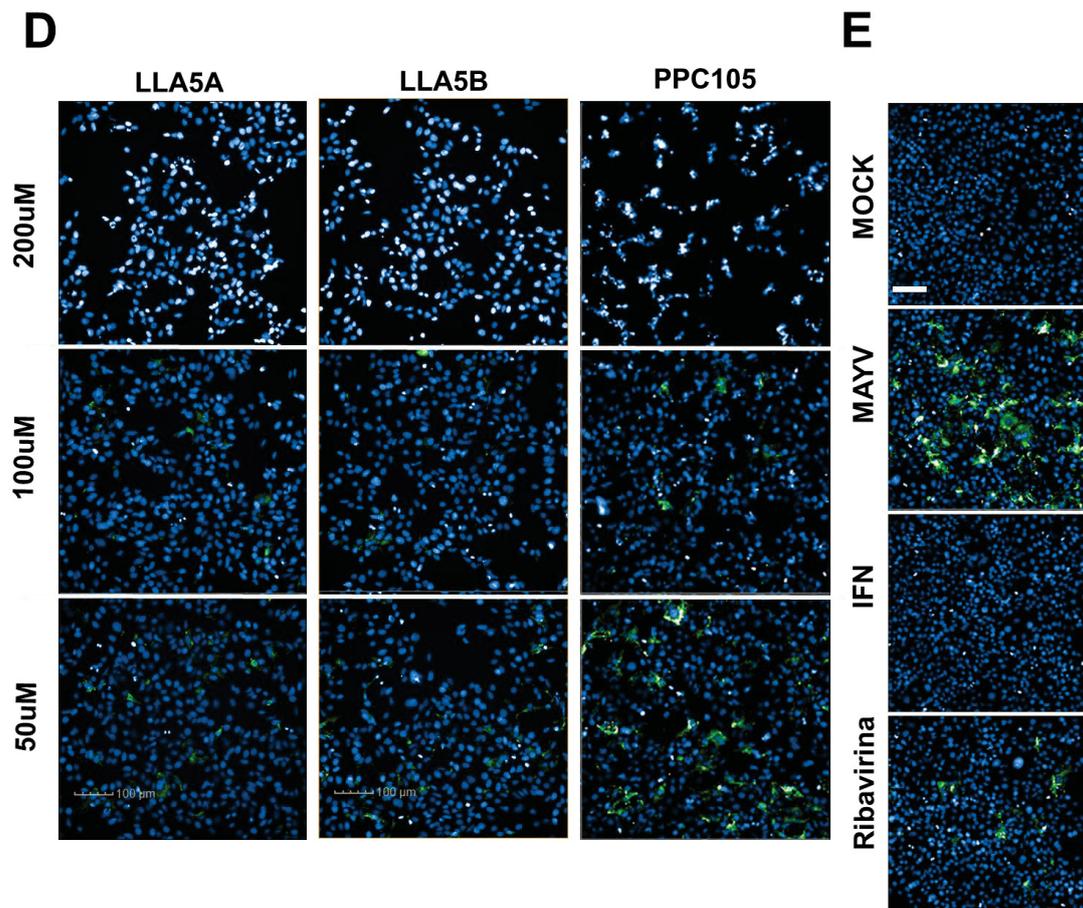
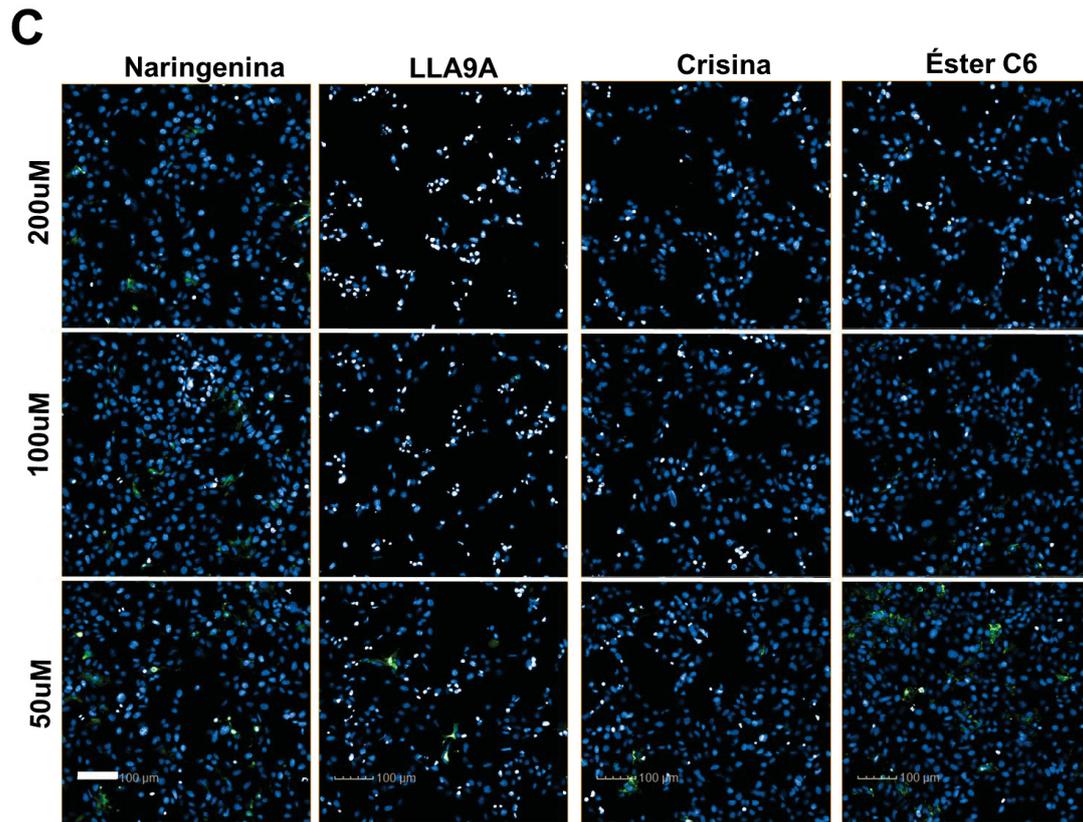
O perfil de curva dose/resposta e valores de  $CC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e IS dos 7 compostos selecionados são mostrados na Figura 9B. Para cada grupo de substâncias foram selecionados os dois compostos com melhor IS, sendo chamados de compostos candidatos anti-MAYV (Figura 9C): naringenina, LLA9A, crisina e éster C6. O carbamato PPC105 foi descartado como composto promissor, pois, imagens da microscopia (figura 9D), mostraram toxicidade superior alterações nucleares iniciais (condensação nuclear) bem pronunciadas. Assim, por mais que a quantificação nuclear não foi alterada, o composto mostrou-se ser tóxico na concentração que o classificou como candidato. Também foram descartados os compostos LLA5A e LLA5B, por possuírem IS menor que naringenina e LLA9A (figura 9D).

A



B



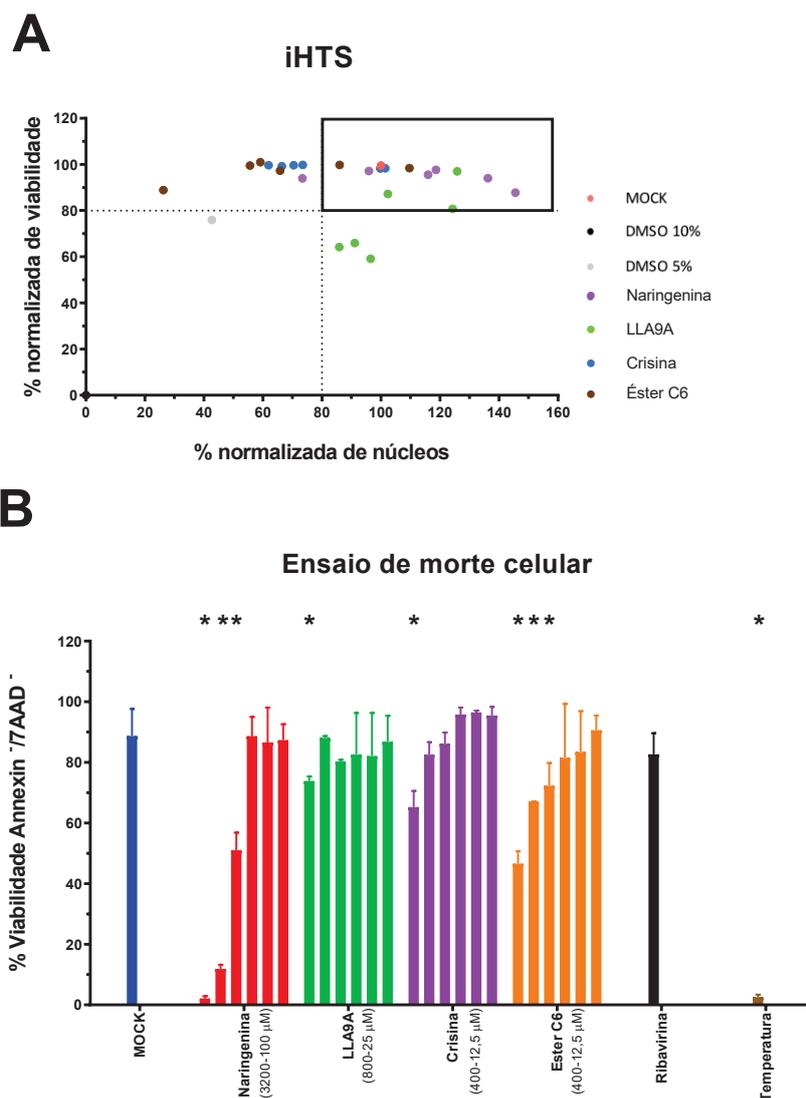


**Figura 9:** Triagem dos compostos com atividade anti-MAYV. Em A, 30 compostos flavonoides (azul), 22 carbamatos (laranja) e 52 compostos da biblioteca *Tocriscreen* aprovada pela FDA (n° 5932; cinza) foram analisados quanto a sua atividade antiviral contra MAYV\_D (MOI 0,5; 24 h.p.i.) por *iHTS* utilizando células Huh7.5. A distribuição dos pontos do gráfico de dispersão mostra a média da atividade de cada concentração (200, 100 e 50  $\mu$ M), em duplicata técnica, dos compostos utilizando as porcentagens normalizadas de redução da infecção e de número de núcleos. A caixa no gráfico corresponde aos compostos que possuíram valores  $\geq 80\%$  de redução da infecção viral e  $\geq 80\%$  de quantificação nuclear, também chamados de compostos candidatos anti-MAYV. Cada ponto do gráfico corresponde a duplicata técnica do teste de triagem. Os círculos de controle na figura A correspondem: rosa-MOCK; preto-vírus MAYV; verde-IFN; e castanho-ribavirina (RIB). A curva dose resposta com valores de  $CC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e IS dos compostos com  $\leq 80\%$  de redução da infecção viral e  $\leq 80\%$  de quantificação nuclear são demonstrados em B. O representativo das imagens adquiridas por IFI de cada concentração testada dos compostos que ficaram dentro dos parâmetros são mostrados: C) os compostos classificados com candidatos anti-MAYV; D) os compostos descartados por IS ou citotoxicidade; e E) os controles MOCK, MAYV, IFN e Ribavirina. Nas imagens, em azul está marcado o núcleo celular por DAPI e, em verde o MAYV através do mAb 1G1 seguido de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. As barras brancas correspondem a 100  $\mu$ m. Para cálculos de  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$  foi utilizado análise de regressão não linear seguido do teste de inclinação variável.

## 6.5 DETERMINAÇÃO DA DMNT

A DMNT foi determinada por duas metodologias, *iHTS* e morte celular por citometria de fluxo. A etapa inicial foi baseada nas doses da triagem dos compostos candidatos (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6), utilizando 6 concentrações para cada composto (400, 200, 100, 50, 25 e 12,5  $\mu$ M). As concentrações que conferiam mais que 80% de viabilidade celular, pelo método de quantificação nuclear (marcação de DAPI) foram consideradas como dose não tóxica e, a partir delas, selecionamos a maior concentração como a DMNT. Baseado nessa premissa, determinamos para naringenina, LLA9A, crisina e éster C6 as concentrações de 200, 50, 25 e 25  $\mu$ M, respectivamente (figura 10A).

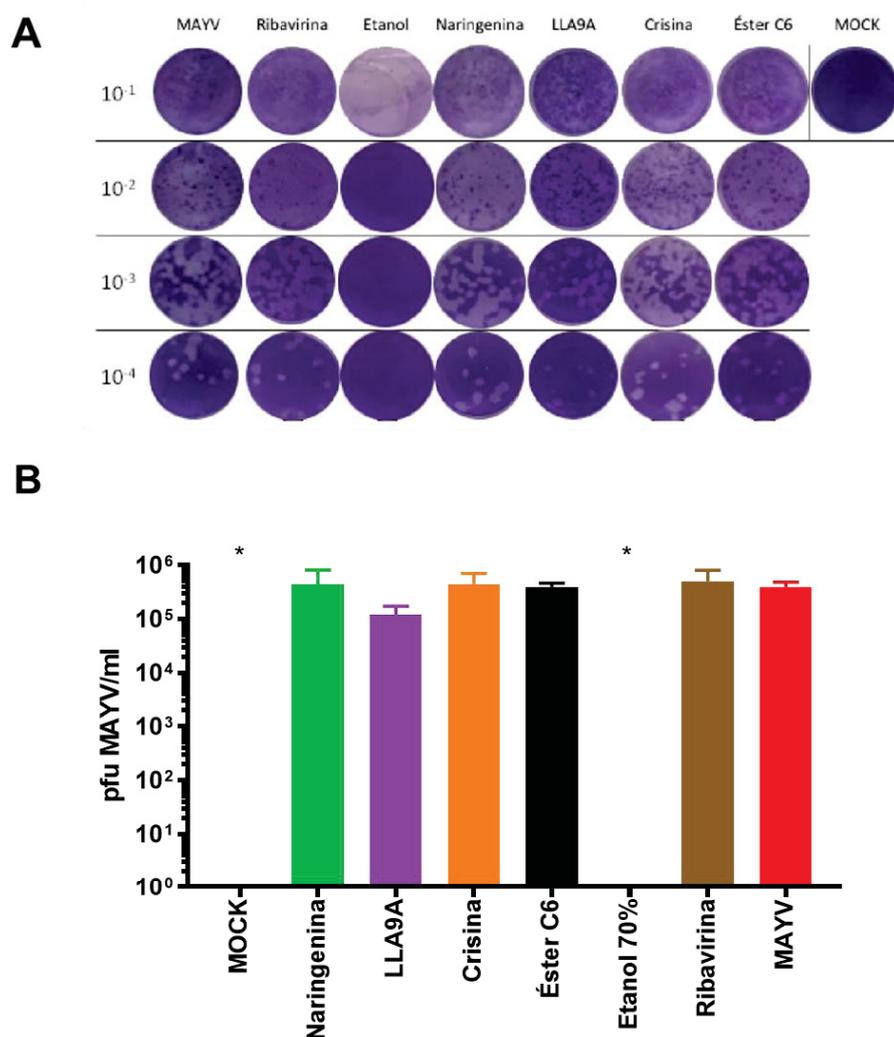
Com o intuito de confirmar essas doses e de acordo com os dados obtidos anteriormente, determinamos 6 novas doses, contemplando doses maiores e menores das pré-definidas pelo sistema *iHTS*, para utilizar na citometria de fluxo. Estas concentrações foram utilizadas para analisar a morte celular induzida pelos compostos candidatos utilizando os marcadores *Annexin V* (FITC) e 7-AAD (figura 10B). Com o resultado da citometria, confirmamos que as doses selecionadas por *iHTS* como não-tóxica e são 2x menor que a margem de segurança determinada por citometria (figura 10B).



**Figura 10:** Determinação da dose máxima não tóxica (DMNT) dos compostos candidatos anti-MAYV. Em A, determinamos a DMNT utilizando o sistema *iHTS* com o critério de seleção sendo a maior concentração do composto em teste que possua viabilidade e quantificação nuclear maior que 80% quando comparado com o controle de morte celular (DMSO 10%). As concentrações testadas variaram entre 400 a 12,5  $\mu\text{M}$  para todos os compostos candidatos, diluídos sericamente (1:2). Definimos assim, 200, 50, 25 e 25  $\mu\text{M}$  para naringenina, LLA9A, crisina e éster C6, respectivamente. A fim confirmatório, utilizamos o ensaio de morte celular (Anexina V e 7AAD; em B) com 6 concentrações diferentes para cada composto escolhidas a partir das concentrações definidas no *iHTS* (naringenina – 3200 à 100  $\mu\text{M}$ ; LLA9A – 800 à 25  $\mu\text{M}$ ; crisina e éster C6 – 400 à 12,5  $\mu\text{M}$ ). Células consideradas viáveis são aquelas duplo-negativo de marcação (Anexina V /7AAD<sup>-</sup>) e consideradas não viáveis aquelas positivas por um dos marcadores, sendo o controle de morte celular as células expostas a 56 °C por 30 min (Temperatura). Diferença estatística contra o controle celular (MOCK) está representado por (\*) quando analisado usando ANOVA seguido por teste de Tukey ( $p < 0,001$ ) de três réplicas biológicas em triplicata técnica.

## 6.6 ENSAIO VIRUCIDA

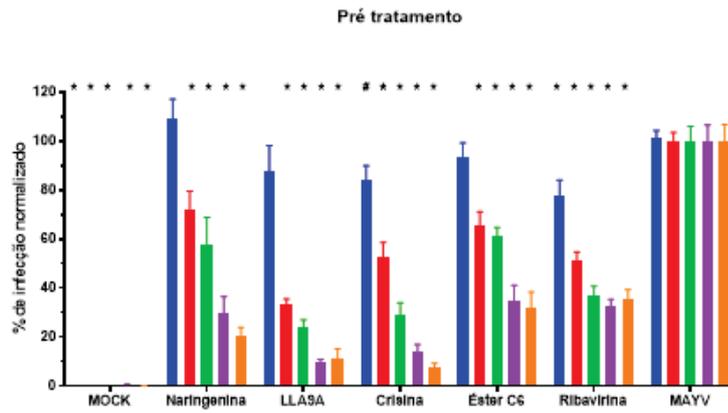
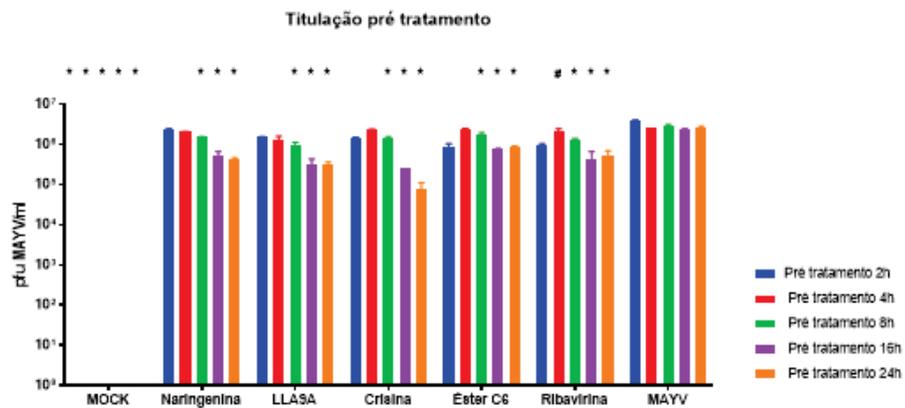
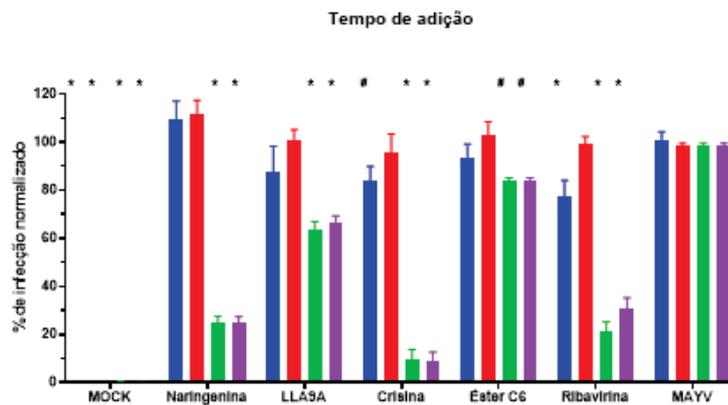
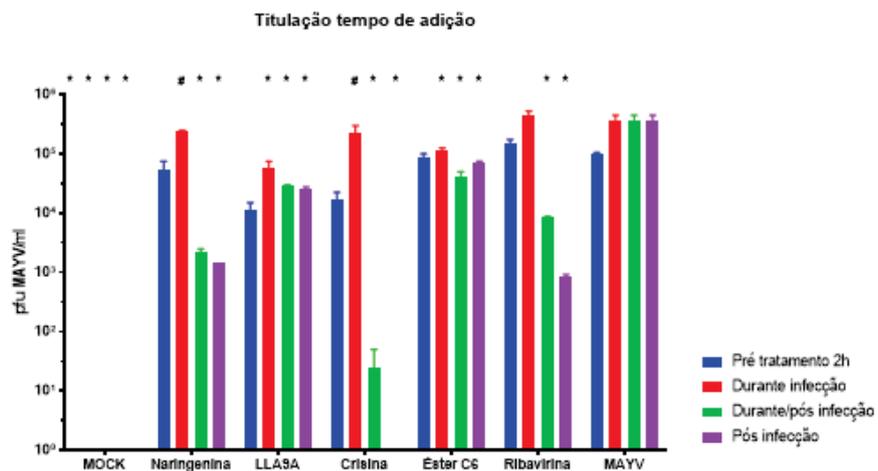
A fim de determinar a ação direta do (s) composto (s) sobre o vírus, o ensaio virucida foi realizada através de titulação viral por formação de placas (Figura 11A), utilizando a DMNT para cada composto. Assim, verificou-se que a infecção viral se manteve constante quando o MAYV foi exposto diretamente aos diferentes compostos, pois não houve diferença estatística quando comparados o título viral dos tratamentos com o controle infectado MAYV\_D (Figura 11B).



**Figura 11:** Ensaio virucida dos compostos candidatos anti-MAYV. O MAYV\_D foi exposto as DMNT de cada composto candidato (naringenina - 200  $\mu$ M, LLA9A – 50  $\mu$ M, crisina - 25  $\mu$ M e éster C6 – 25  $\mu$ M) a fim de determinar a ação virucida do composto. Ao findar o tempo de incubação, prosseguiu-se com a titulação por formação de placa corada com cristal violeta (A) e a análise estatística dos dados obtidos por meio de contagem das placas formadas (B). O Etanol 70% foi utilizado como controle virucida do ensaio. Diferença significativa contra o grupo MAYV está representada por (\*) quando comparados, usando ANOVA seguido por teste de Tukey ( $p < 0,001$ ) de três réplicas biológicas em triplicata.

### **6.7 ENSAIO DE TEMPO DE ADIÇÃO**

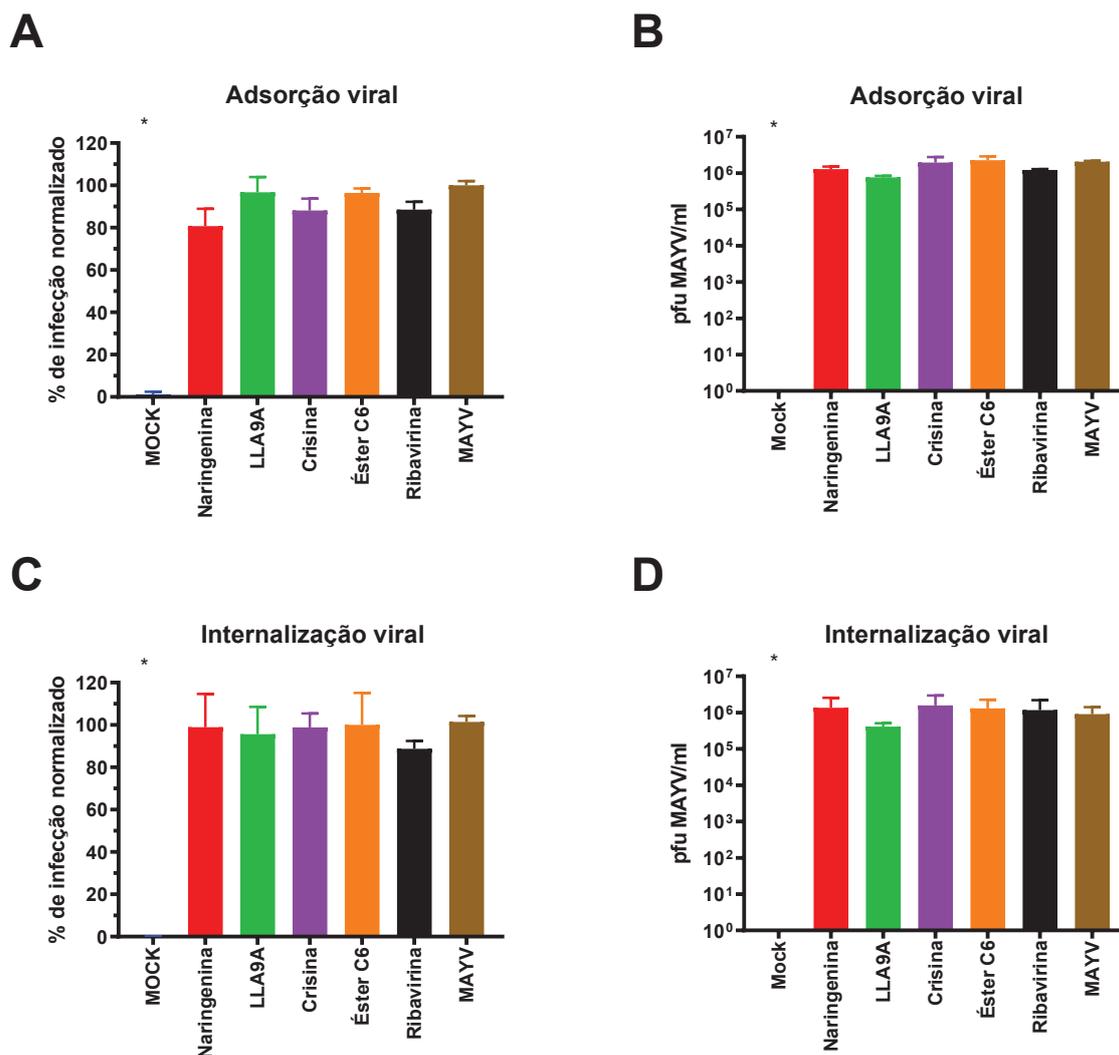
O ensaio de tempo de adição foi realizado para determinar em que etapa do ciclo de replicação viral os compostos apresentam atividade. O ensaio foi dividido em três etapas gerais: tratamento pré-infecção das células Huh-7.5 (Figura 12 A-B), tratamento durante a infecção e tratamento pós-infecção (Figura 11C-D). Ao analisar os tempos de pré-tratamento, uma diminuição progressiva da infecção é observada, diretamente proporcional ao aumento do tempo de contato entre o composto e a célula que, posteriormente, foi infectada (Figura 12A). Também, se observa diferença significativa no tempo pós-infecção, quando comparado com o controle infectado (MAYV; Figura 12C – barra lilás). Entretanto, ao analisar o tratamento durante infecção, em nenhum composto testado é observada diferença estatística quando comparados com o controle MAYV (Figura 12C – barra vermelha). Além disso, os dados de infecção viral se comportam igual ao analisar a liberação de partículas virais por meio da titulação do sobrenadante proveniente do ensaio (Figura 12 B-D).

**A****B****C****D**

**Figura 12:** Ensaio de tempo de adição dos candidatos anti-MAYV. Em diferentes momentos, foi adicionado os tratamentos nas DMNT (naringenina - 200  $\mu$ M, LLA9A – 50  $\mu$ M, crisina - 25  $\mu$ M e éster C6 – 25  $\mu$ M), nos tempos que precedem a infecção (em A e B; barras azuis - 2 horas de pré-tratamento, vermelhas - 4 horas de pré-tratamento, verde - 8 horas de pré-tratamento, roxas - 16 horas de pré-tratamento, laranjas - 24 horas de pré-tratamento), ao mesmo tempo que ocorre a infecção (C e D; barras vermelhas - tratamento durante a infecção) e depois da infecção (C e D; barras lilás - tratamento pós infecção). Como controle do experimento temos as amostras não infectadas (MOCK) e infectado sem tratamento (MAYV), além do controle de atividade antiviral (ribavirina). Após as incubações, prosseguiu-se com a IFI (A-C) e a titulação dos sobrenadantes por ensaio de formação de placas coradas com cristal violeta (B-D), normalização dos dados e análise estatística. Diferença significativa representada por (\*) quando  $p < 0,001$  e (#) quando  $p < 0,05$  ao comparar o grupo infectado (MAYV) correspondente, analisando os dados usando ANOVA seguido por teste de Tukey, de três réplicas biológicas em triplicata.

## 6.8 ENSAIO DE ADSORÇÃO E INTERNALIZAÇÃO VIRAL

Para avançar no entendimento do potencial mecanismo de ação dos compostos candidatos nas etapas iniciais do ciclo replicativo, os ensaios de adsorção e internalização viral foram realizados e avaliados por meio de IFI (Figura 13A-C) e o sobrenadante resultante foi titulado por ensaio de formação de placas (Figura 13B-D). Ambas as técnicas não demonstraram diminuição significativa na infecção viral ou produção de partículas virais viáveis indicando que os compostos não interferem nestas etapas do ciclo de infecção viral.

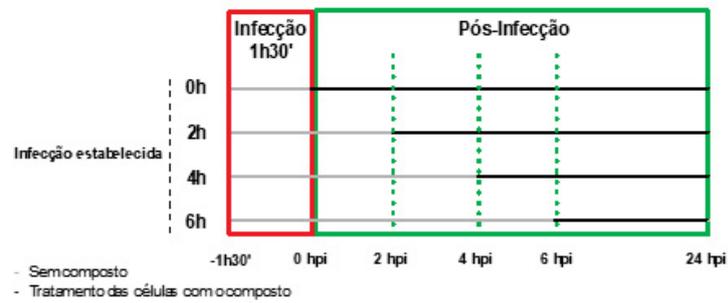


**Figura 13:** Ensaio de adsorção e de internalização viral dos compostos candidatos anti- MAYV. A ação dos compostos anti-MAYV (naringenina - 200  $\mu$ M, LLA9A – 50  $\mu$ M, crisina - 25  $\mu$ M e éster C6 – 25  $\mu$ M) foram analisados na capacidade de interação com o MAYV\_D em dois momentos distintos na replicação, na adsorção e na internalização. Em A e C, é demonstrada a análise através dos dados normalizados do sistema *iHTS*, respectivamente, através da marcação do mAb 1G1 seguido de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. Em B e D, quantificação das partículas virais viáveis do sobrenadante oriundo dos ensaios de A e C, por meio do ensaio de titulação viral por formação de placa, respectivamente. Em ambos ensaios e técnicas não houve diferença estatística (\*) na infecção por MAYV quando analisado usando ANOVA seguido por teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) de três réplicas biológicas em triplicata.

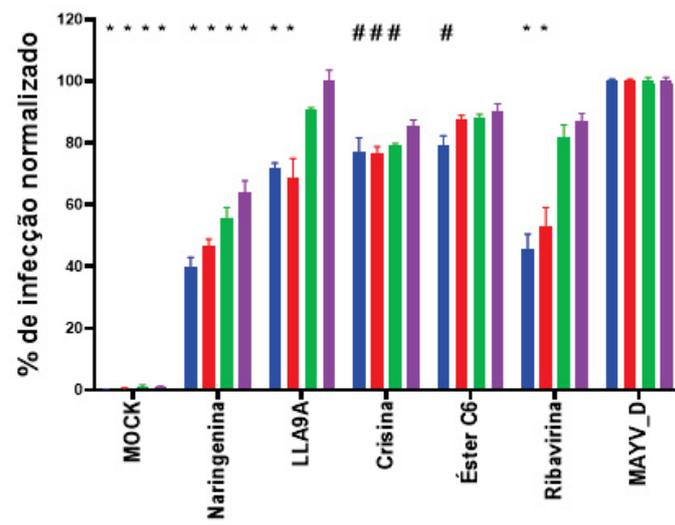
## 6.9 TESTE DE EFICÁCIA ANTIVIRAL EM INFECÇÃO ESTABELECEIA

O ensaio consiste em avaliar quanto tempo, após a infecção, os compostos candidatos anti-MAYV possuem efeito na redução da porcentagem de células infectadas quando comparadas ao controle positivo infectado não tratado (MAYV\_D; Figura 14A). O composto naringenina reduziu a infecção em todos os tempos testados (0hpi, 2hpi, 4hpi e 6hpi) (Figura 14B). LLA9A obteve resultados parecidos com o controle antiviral (ribavirina), possuindo diferença até 2hpi (Figura 14B). A crisina reduziu estatisticamente a infecção até 4hpi e éster C6 apenas quando adicionado no tempo 0hpi (Figura 14B). Além disso, a titulação demonstrou a que produção de partículas viáveis de MAYV\_D seguiu a mesma tendência demonstrada na IFI (Figura 14C). Esses dados em conjunto com o ensaio de tempo de adição sugerem que, todos os compostos candidatos podem estar atuando na replicação, maturação ou montagem das partículas virais.

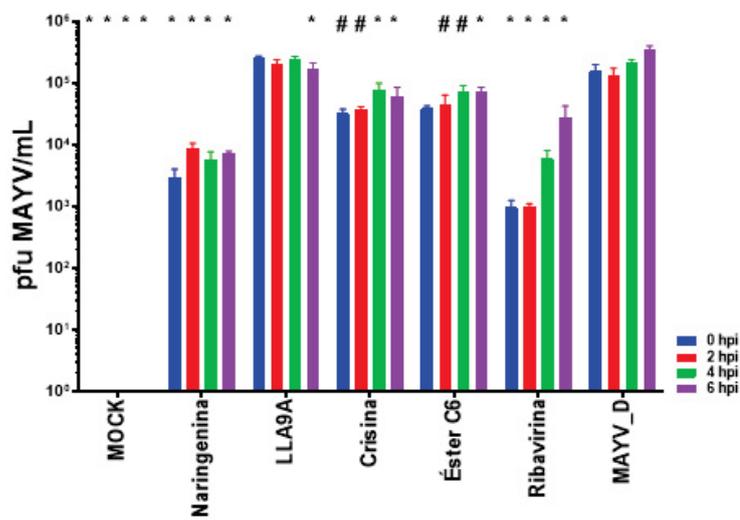
A



B



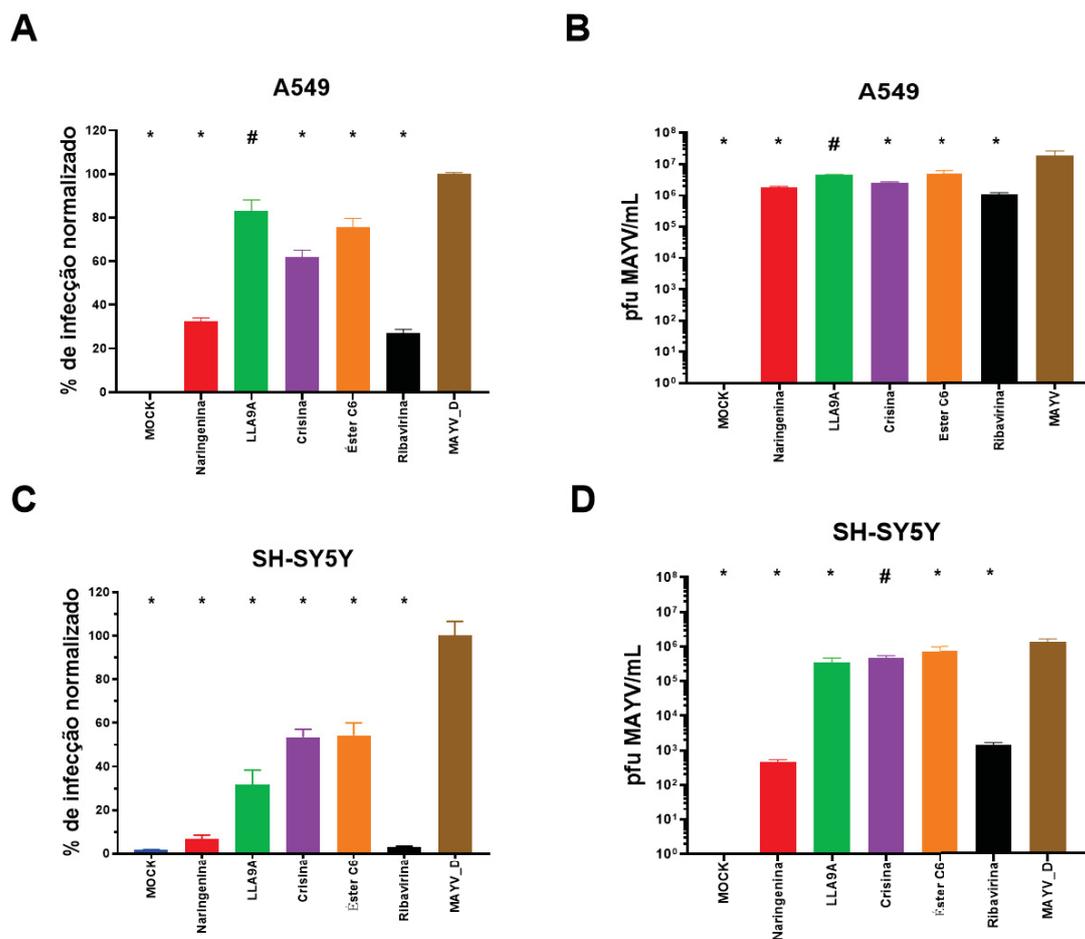
C



**Figura 14:** Teste de eficácia antiviral dos compostos candidatos anti-MAYV em infecção estabelecida. Os compostos candidato anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6) e o controle antiviral (ribavirina) foram avaliados quanto a sua ação antiviral ao decorrer da infecção (células Huh-7.5; MAYV\_D MOI 0,5, 24h), sendo adicionadas as DMNT de cada composto, conforme esquema em A, nos tempos 0h (azul), 2h (vermelho), 4h (verde) e 6h (rosa) após o estabelecimento da infecção. Dados obtidos da IFI através da marcação de com anticorpo monoclonal 1G1 seguido de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (B) e da titulação do sobrenadante (C) são mostrados em forma de gráficos. Diferença significativa contra o grupo infectado não tratado (MAYV\_D) está representada por (\*) quando  $p < 0,0001$  e (#) quando  $p < 0,05$ , usando ANOVA duas vias seguido por teste de Tukey da média de três réplicas biológicas em cada um em triplicata técnica.

#### **6.10 TESTE DE EFICÁCIA ANTIVIRAL EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES**

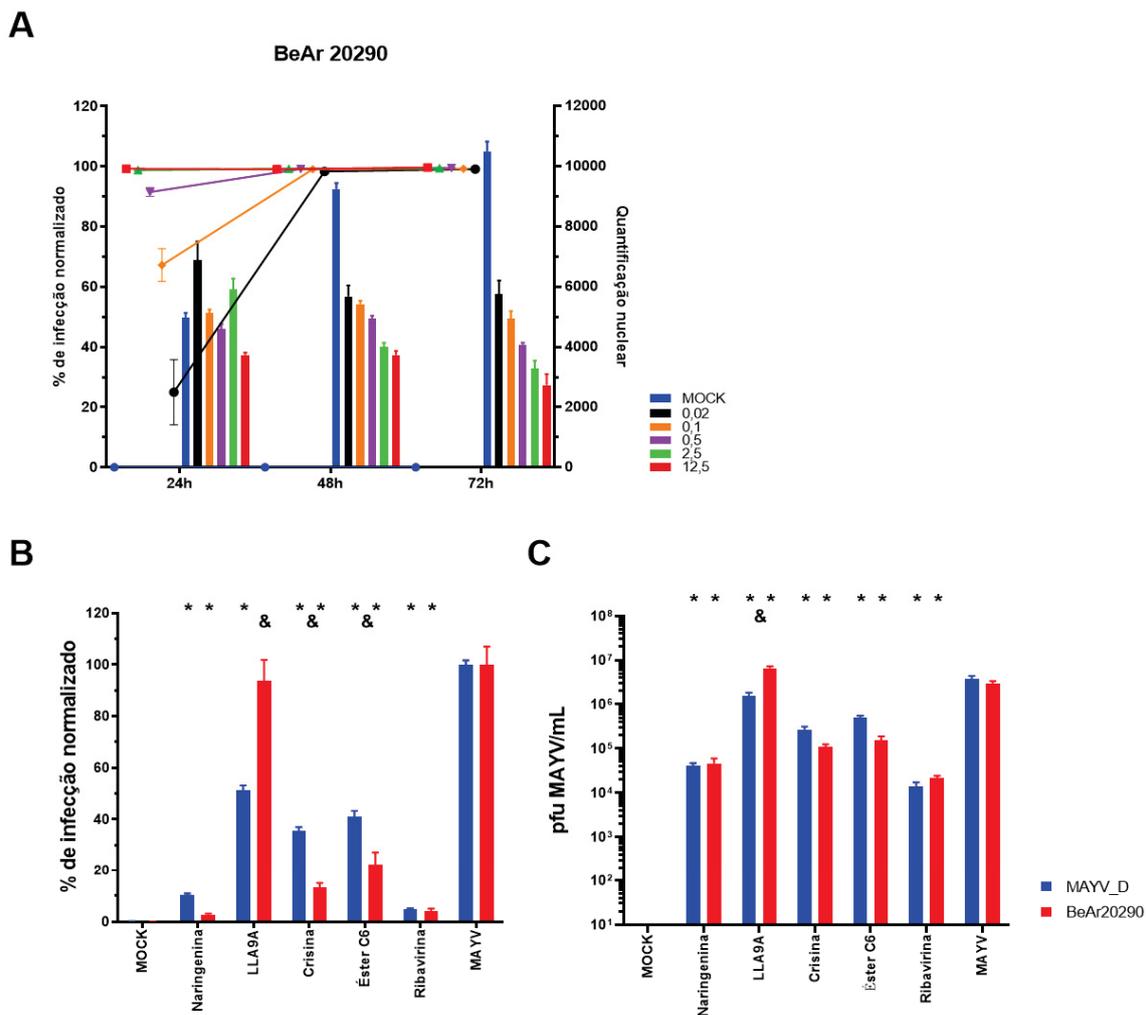
Como a infecção pelo MAYV pode atingir diferentes órgãos em hospedeiros, analisamos se o efeito antiviral dos compostos candidatos anti-MAYV é limitado apenas em células hepáticas ou pode atuar independente da linhagem celular. Por isso, analisamos a ação anti-MAYV dos compostos durante infecção das linhagens celulares humanas de origem pulmonar (A549; Figura 15A-B) e neuronal (SH-SY5Y; Figura 15C-D) com MAYV\_D. Todos os compostos (naringenina, LLA9A, crisina e éster C6) reduziram a porcentagem de células infectadas (Figura 15A-C) e produção de partículas virais (Figura 15B-D) quando comparadas ao controle não infectado, indicando que a ação dos compostos é independente do tipo de célula infectada.



**Figura 15:** Teste de eficácia antiviral dos compostos candidatos anti-MAYV em célula de epitélio pulmonar humano (A549) e neuronal (SH-SY5Y). Células A549 (A-B) e SH-SY5Y (C-D) foram infectadas com MAYV\_D (MOI 1) e tratadas com a DMNT de cada composto candidato anti-MAYV (naringenina em vermelho, LLA9A em verde, crisina em lilás, éster C6 em laranja) conforme metodologia pós infecção (figura 2). Como controle antiviral utilizamos ribavirina (em preto). Em A e C, é demonstrado por gráficos os dados de infecção normalizada obtidos por IFI e, em B e D, os dados do sobrenadante titulado por meio de formação de placas. Diferença significativa contra o grupo infectado não tratado (MAYV\_D) está representada por (\*) quando  $p < 0,0001$  e (#) quando  $p < 0,005$ , usando ANOVA uma via seguido por teste de Tukey da média de três réplicas biológicas em triplicata.

### **6.11 TESTE DE EFICÁCIA ANTIVIRAL EM DIFERENTES CEPAS DE MAYV**

Por meio de análises filogenéticas, foram identificados 3 genótipos de MAYV, a saber D, L e N, sendo o D e o L os mais prevalentes. Assim, para avaliar se o efeito dos compostos candidatos anti-MAYV é genótipo específico, avaliamos a porcentagem de células infectadas com duas cepas diferentes de MAYV: genótipo D (MAYV\_D; Figura 16B; barras azuis) e L (BeAr20290; Figura 16B; barras vermelhas). Inicialmente, padronizamos a infecção do MAYV BeAr20290 na linhagem celular Huh-7.5. Determinamos que o MOI 0,1 por 24 hpi a melhor condição de infecção. A partir dessa determinação, analisamos a eficácia dos compostos candidatos anti-MAYV para este genótipo também. Com exceção ao composto LLA9A que obteve diferença estatística apenas na infecção por MAYV\_D, todos os outros compostos (naringenina, crisina e ésterC6) diminuíram a infecção (Figura 16B) e produção de partículas virais (Figura 16C) de ambas as cepas, sendo mais expressivo no genótipo L (Figura 16B), dado esse também confirmado através da metodologia de titulação (Figura 16C). Deste modo demonstramos que a atividade anti-MAYV dos compostos naringenina, crisina e éster C6 é independente do genótipo de MAYV responsável pela infecção.



**Figura 16:** Teste de eficácia antiviral dos compostos candidatos anti-MAYV em diferentes cepas de MAYV. Em A, demonstramos a padronização da infecção para a cepa BeAr20290, com diferentes MOIs (0,02 - preto, 0,1 - laranja, 0,5 - lilás, 2,5 - verde e 12,5 - vermelho) e diferentes tempos (24, 48 e 72 h.p.i.). As barras correspondem a quantificação absoluta de núcleos no campo visual adquirido e, as linhas correspondem a porcentagem de células infectadas de MAYV normalizadas. Assim, células Huh-7.5 foram infectadas com a cepa MAYV\_D (azul; MOI 0,5) ou BeAr20290 (vermelho; MOI 0,1) e tratadas com os compostos candidatos anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e ésterC6) ou ribavirina (controle antiviral). Após 24h de tratamento seguindo a metodologia pós infecção e realização da IFI, a porcentagem de células infectadas foi analisada (B). Em C, é demonstrado os dados obtidos da titulação por formação de placas corada com cristal violeta dos sobrenadantes. Diferença significativa contra o respectivo grupo infectado não tratado (MAYV\_D ou BeAr20290) está representada por (\*) quando  $p < 0,0001$  e quando comparada a porcentagem de infecção das duas cepas com o mesmo tratamento está representada por (&) com  $p < 0,005$ , usando ANOVA duas vias seguido por teste de Tukey da média de três réplicas biológicas em triplicata.

## 7. DISCUSSÃO

O MAYV é um vírus relacionado a surtos frequentes nos estados do Pará e Amazonas, embora mais recentemente, casos de infecção tenham sido notificados em outras regiões do país, confirmando a dispersão desse vírus (BRASIL, 2019; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; LIMA-CAMARA, 2016; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MAVIAN *et al.*, 2017). Não há estratégias imunoproláticas ou tratamentos antivirais disponíveis para infecções por MAYV, conseqüentemente, a investigação de compostos com potencial efeito antiviral é de extrema valia para preencher esta lacuna. Neste estudo, demonstramos, em ensaios *in vitro*, que compostos flavonóides, como naringenina e crisina são potenciais compostos-candidatos anti-MAYV. A atividade antiviral destes compostos foi descrita para outros arbovirus como CHIKV (AHMADI *et al.*, 2016; POHJALA *et al.*, 2011), DENV (FRABASILE *et al.*, 2017; SUROENGRIT *et al.*, 2017), ZIKV (CATANEO *et al.*, 2019; SUROENGRIT *et al.*, 2017), SARS-CoV-2 (GULER *et al.*, 2021; TUTUNCHI *et al.*, 2020) e hepatite C (GOLDWASSER *et al.*, 2011; SAJITHA LULU *et al.*, 2016), em todos os casos relacionados e atividade durante etapas de síntese do RNA viral.

A plataforma *iHTS* tem sido amplamente utilizada para a avaliação de citotoxicidade e atividade antiviral de compostos em linhagens celulares (ABRAHAM *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2013; MARTIN, Heather L *et al.*, 2014). Trata-se de uma plataforma de alta eficiência e rendimento, permitindo a triagem simultânea de um grande número de compostos com a vantagem de ser customizável para a inclusão de novos vírus. A avaliação do potencial citotóxico dos compostos testados é mais efetiva, possibilitando detectar efeitos pré-apoptóticos (por exemplo, mudanças morfológicas no núcleo e citoplasma), além de substituir várias técnicas clássicas de avaliação de toxicidade celular (como MTT, Vermelho Neutro e detecção de morte celular por Anexin), em um único teste, aumentando a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. (MARTIN, Heather L *et al.*, 2014; O'BRIEN *et al.*, 2006). Adicionalmente, por ser um sistema automatizado, tem o potencial de limitar a subjetividade da interpretação dos dados, aumentando a confiabilidade do resultado, além da possibilidade da análise individual de cada célula que está sendo testada (LUCKE; MUMTSIDU, 2009). A padronização inicial de todos os parâmetros do teste, visa diminuir o viés de interpretação tornando os dados mais confiáveis. Como exemplo da importância desta etapa de validação, a escolha da célula utilizada no ensaio fundamental, pois a hepatotoxicidade medicamentosa, que é considerado o principal efeito relacionado à retirada de medicamentos do mercado, pode ser prevista utilizando células derivadas de fígado humano, como a Huh7 (CVCL\_0336), Huh7.5 (ATCC PTA-

8561) e HepG2 (ATCC HB-8065) (FUNG *et al.*, 2001). Além disso, ensaios que permitem a detecção de alterações celulares em fase inicial e sutis (exemplo: condensação citoplasmática e nuclear), reduzem as chances destas substâncias prosseguirem para fases posteriores de triagem, aumentando a segurança da utilização dos compostos (ABRAHAM *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2013; FUNG *et al.*, 2001; MARTIN, Heather L *et al.*, 2014; O'BRIEN *et al.*, 2006).

Além da toxicidade induzida pelo composto a ser testado, alguns estudos demonstram que o MAYV, ao entrar na célula hospedeira, induz aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular causando estresse oxidativo, além de promover alterações no metabolismo da glicose através da ativação da enzima 6-phosphofructo 1-kinase (CAETANO *et al.*, 2019; EL-BACHA *et al.*, 2004), induzindo intenso efeito citopático. Nossos dados demonstram uma diminuição acentuada na quantidade de núcleos em todas as linhagens infectadas (C6/36, Huh-7.5, A549 e A172) sendo mais acentuada na linhagem Vero E6. Essa informação é relevante, pois a literatura indica que essa linhagem é a mais utilizada em triagens de compostos com ação anti-MAYV (AMORIM *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2014), mesmo tratando-se de uma linhagem derivada de rim de macaco. Com isso, buscando validar o sistema com células mais relevantes do ponto de vista clínico-farmacológico, selecionamos a linhagem Huh-7.5 (derivada de hepatocarcinoma humano) para os testes. Essa escolha foi baseada em: 1) essa linhagem foi permissiva a infecção por MAYV; e 2) como citado anteriormente, o dano hepático induzido por compostos é o ponto mais crítico da avaliação dos compostos (ABRAHAM *et al.*, 2008; FUNG *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 2006).

Infecções por membros da família *Togaviridae*, na sua maioria, induzem alterações no citoesqueleto da célula infectada promovendo a produção de prolongamentos, *philopodia-like structures*, que facilitam a infecção de células vizinhas (BROWN; WAN; KIELIAN, 2018; HAHON; ZIMMERMAN, 1970; MARTINEZ *et al.*, 2014). Ao aumentar a densidade celular no poço, diminuindo a distância entre as células, a infecção foi mais homogênea, por facilitar o contato célula-célula através dos prolongamentos induzidos pelo MAYV, melhorando os índices de qualidade do teste estatístico. Ademais, a escolha da metodologia de infecção para o teste de triagem foi de extrema importância, pois permitiu menos manipulação no ensaio, diminuindo a taxa de erro, possibilitando maior agilidade na montagem do teste e maior número de compostos triados por vez, conforme literatura nos indica (CRUZ *et al.*, 2013).

Em estudos de triagem de compostos que possuem atividade antiviral, os controles de tratamento utilizados são o IFN- $\alpha$  2A (CATANEO *et al.*, 2019; ISHIDA *et al.*, 2021) e a ribavirina (DOS SANTOS *et al.*, 2014; SPINDOLA *et al.*, 2014). Ambos compostos atuam em etapas distintas da replicação viral, seja na inibição da síntese

proteica das glicoproteínas de envelope (FERREIRA; REBELLO, 1998a; GRABARZ *et al.*, 2021; REBELLO *et al.*, 1994) ou impedindo o início da replicação viral por interferir na reação de capeamento do RNA viral, por ser um análogo de guanina (BRIOLANT *et al.*, 2004; CUMMINGS *et al.*, 2001; GRACI; CAMERON, 2006; ROTHAN *et al.*, 2015), respectivamente. Em ensaios anteriores onde não havia sido padronizada a infecção, o IFN- $\alpha$  2A não apresentou atividade antiviral (dados não mostrados). Essa ausência de inibição da infecção possivelmente ocorreu por termos saturado o sistema, isto é, mais que 90% das células estavam positivas para o MAYV (FERREIRA; REBELLO, 1998a; HE *et al.*, 2006; SU; LIAO; LIN, 2002). Quando as condições de infecção foram ajustadas em relação ao MOI e tempo de infecção e realizado o teste de curva dose-resposta, o IFN- $\alpha$  2A teve o efeito inibitório relatado na literatura. Assim, os dados indicam que o IFN- $\alpha$  2A induziu um estado antiviral nas células, desde que o sistema não esteja saturado, em todas as concentrações testadas (mesmo na concentração que não havia apresentado atividade anteriormente) e pode ser utilizado como controle de atividade anti-MAYV nos testes de triagem (FERREIRA; REBELLO, 1998b). Por outro lado, a Ribavirina, utilizada em condições similares ao IFN- $\alpha$  2A, controlou a infecção mesmo com o sistema saturado (dados não mostrados) e em doses baixas, sendo considerada assim, mais efetiva para ser utilizada como controle positivo de atividade antiviral (GRACI; CAMERON, 2006).

A triagem dos compostos da biblioteca Tocriscreen foi iniciada e avaliada quanto a sua atividade antiviral contra o MAYV. Essa biblioteca contém 159 substâncias que possuem aprovação de comercialização e de uso em humanos pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (do inglês, U.S. Food and Drug Administration – FDA) e muitas delas possuem também autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA). Ou seja, a reposição de fármacos de qualquer composto que demonstre ser eficaz contra o MAYV, passará mais rápido pelas etapas de validação, visto que a citotoxicidade é conhecida, tanto experimental como clinicamente (ALBULESCU *et al.*, 2020; LANGENDRIES *et al.*, 2021). Entretanto, dos 52 compostos testados até o momento (Anexo I), nenhum mostrou-se promissor.

A triagem dos compostos pertencentes a biblioteca do Laboratório de Virologia Molecular, demonstrou que a naringenina e a crisina possuem efeito inibitório contra a infecção viral e que modificações na estrutura das substâncias alteram tanto a citotoxicidade (ALBUQUERQUE DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2020; SUROENGRIT *et al.*, 2017; ZANELLO *et al.*, 2015), bem como a atividade contra o MAYV. As alterações na estrutura dos compostos que originaram os derivados de naringenina e crisina impactaram positiva e negativamente na quantificação nuclear, provavelmente, por induzirem a proliferação e a toxicidade celular, respectivamente (KEILER *et al.*, 2015).

Além disso, a infecção viral também é afetada, visto que o tratamento com alguns compostos diminuíram e outros aumentaram a porcentagem de células infectadas quando comparadas ao controle MAYV (PAREDES *et al.*, 2003; ZANDI *et al.*, 2012). Entretanto, esses dados devem ser analisados com cautela e a realização de ensaios complementares deverão ser realizados para embasar essas observações (AHMADI *et al.*, 2016; MURALI *et al.*, 2015; POHJALA *et al.*, 2011). Todavia, as alterações realizadas durante a síntese do derivado LLA9A de naringenina apresentou menor toxicidade tanto para a linhagem Huh7.5, bem como para a linhagem A549 (ALBUQUERQUE DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2020; CATANEO *et al.*, 2019), mas foi menos eficiente em relação a inibição da infecção de MAYV e de ZIKV (ALBUQUERQUE DE OLIVEIRA MENDES *et al.*, 2020; CATANEO *et al.*, 2019) quando comparado com o composto de origem.

A partir da triagem e seleção dos compostos mais promissores, determinamos, no mesmo sistema já padronizado (em células Huh7.5), a DMNT de cada composto utilizando dois parâmetros sobre a citotoxicidade: diminuição da quantidade de células no poço e intensidade de marcação do DAPI. Esse segundo parâmetro demonstra, morfológicamente, o grau de condensação do DNA nuclear quando comparado com o controle não tratado e não infectado, ou seja, quanto maior o valor da intensidade de marcação mais condensado estará o núcleo, correspondendo a etapa inicial da apoptose celular (MARTIN, H.L. *et al.*, 2014; O'BRIEN *et al.*, 2006). Quando esse valor é normalizado em relação ao controle não tratado (ou seja, controle celular), o viés relacionado à replicação celular é corrigido e, os valores acima da intensidade de marcação definida nos poços tratados, são, então, células entrando em apoptose. Devido a essas observações, a técnica de marcação com Anexina V e 7-AAD foi escolhida para confirmação dos dados, já que esses marcadores avaliam a morte celular através da marcação de fosfatidilserina na membrana plasmática externa e do núcleo celular (sugerindo permeabilidade celular), indicando apoptose e necrose celular, respectivamente (CATANEO *et al.*, 2019; GARVEY *et al.*, 2016; MARTIN, H.L. *et al.*, 2014). Assim, demonstramos que os resultados obtidos pelo sistema *iHTS* corresponde aos valores obtidos pela metodologia de quantificação de apoptose mais comumente utilizada. Tal resultado demonstra que a concentração de uso definida como DMNT está com margem de segurança alta (2x menor), portanto a sensibilidade da técnica *iHTS* está precedendo mudanças sutis pré-apoptóticas de núcleo e membrana (MARTIN, H.L. *et al.*, 2014; O'BRIEN *et al.*, 2006) que não são vistas no ensaio comparado. Ao comparar as DMNT com outros estudos, confirmamos que a concentração definida está abaixo da concentração tóxica para A549 tratada com naringenina (1,25x menor)

(CATANEO *et al.*, 2019) e para BHK tratada com crisina (8x menor) (POHJALA *et al.*, 2011).

Com a DMNT determinada, prosseguimos com ensaios que indicam o mecanismo de ação de cada um dos compostos utilizados. Inicialmente, a primeira questão a ser esclarecida é se a ação na infecção viral está intimamente ligada a partícula já formada ou em etapas críticas da replicação ou ainda, na própria célula hospedeira. O ensaio virucida determina se o composto atua diretamente na partícula viral, por meio de neutralização ou desnaturação proteica de proteínas do virion, que impedirá a entrada do vírus na célula hospedeira (AMORIM *et al.*, 2017; FERRAZ *et al.*, 2019). Para tanto, utilizamos o etanol 70% como controle positivo de ação, pois é um agente desnaturante proteico amplamente utilizado (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013; MOORER, 2003). Nenhum dos compostos candidatos anti-MAYV diferiram estatisticamente do controle de infecção não-tratado, indicando que a ação dos compostos não está agindo na partícula e não impede a interação viral com a célula hospedeira, corroborando os resultados de outros estudos realizados com o CHIKV (AHMADI *et al.*, 2016; POHJALA *et al.*, 2011), SINV (PAREDES *et al.*, 2003), DENV (FRABASILE *et al.*, 2017; SUROENGRIT *et al.*, 2017), ZIKV (CATANEO *et al.*, 2019; SUROENGRIT *et al.*, 2017), SARS-CoV-2 (GULER *et al.*, 2021; TUTUNCHI *et al.*, 2020) e HCV (ELTAHLA *et al.*, 2015; GOLDWASSER *et al.*, 2011).

Os potenciais mecanismos de ação dos compostos candidatos podem ser divididos em três grupos: indução da atividade antiviral na própria célula, atividade durante as etapas de entrada (adsorção, internalização e desnudamento) ou de replicação viral e saída (síntese proteica, replicação do genoma viral, morfogênese e saída da partícula) (ABDELNABI; DELANG, 2020). Com isso, o ensaio de tempo de adição das drogas foi desenhado a fim de se avaliar as diferentes etapas do ciclo replicativo viral, desde a indução de atividade antiviral na célula (pré tratamento), até a ação dos compostos diretamente na replicação viral, tanto em fases iniciais de entrada (durante infecção) como em fases posteriores a entrada viral (pós infecção). Esse formato está sendo bastante utilizado para avaliação da atividade antiviral de diferentes compostos contra os vírus MAYV (AMORIM *et al.*, 2017; SUGASTI-SALAZAR *et al.*, 2022), Venezuelan Equine Encephalitis (AMAYA *et al.*, 2015), ZIKV (CATANEO *et al.*, 2019; FRABASILE *et al.*, 2017) e DENV (CRUZ *et al.*, 2013; FRABASILE *et al.*, 2017; KOISHI *et al.*, 2012; ZANELLO *et al.*, 2015).

O pré-tratamento, apresentou bons resultados de redução da infecção em tempos mais longos. Esse efeito também foi observado em outro estudo envolvendo a naringenina e o ZIKV, onde a redução de infecção foi se acentuando ao longo do tempo

de pré-tratamento, possuindo ação semelhante entre pré-tratamento de 24h e tempo de adição do composto pós infecção viral (CATANEO *et al.*, 2019).

Ao analisar o tratamento durante a infecção e os ensaios específicos de entrada viral que compreende esse tratamento, adsorção e internalização viral, não foi observado diminuição na infecção viral e nem na produção de partículas virais em nenhum dos compostos testados. Esses dados corroboram os resultados descritos em estudos anteriores em ensaios com naringenina e crisina durante infecção com CHIKV (AHMADI *et al.*, 2016; POHJALA *et al.*, 2011), SINV (PAREDES *et al.*, 2003), DENV (FRABASILE *et al.*, 2017; SUROENGRIT *et al.*, 2017) e ZIKV (CATANEO *et al.*, 2019; SUROENGRIT *et al.*, 2017), possivelmente por esses compostos apresentarem atividade durante a replicação.

Resultados de estudos anteriores indicam que os compostos em teste atuam nas fases pós-entrada do vírus na célula, a saber para naringenina, nas proteínas não estruturais virais, como a protease viral (NS2b-NS3) de ZIKV (CATANEO *et al.*, 2019) e a nsP3 de CHIKV (AHMADI *et al.*, 2016; POHJALA *et al.*, 2011). Uma diminuição significativa na porcentagem de células infectadas e de partícula viáveis secretadas não foi observada exclusivamente nos ensaios de infecção em linhagem de células hepáticas, mas também em linhagens de células de origem pulmonar e neuronal, corroborando os resultados demonstrados durante infecção por ZIKV e DENV (CATANEO *et al.*, 2019; FRABASILE *et al.*, 2017). Além disso, em intervalo de tempo maiores de adição dos compostos após o estabelecimento da infecção, o composto naringenina apresentou resultados mais satisfatórios do que o tratamento com ribavirina (controle) (4hpi e 6hpi). O efeito inibitório foi observado durante tratamento com naringenina em infecção pelo ZIKV quando comparado ao controle antiviral (interferon- $\alpha$  2A), em tempos de até 24hpi (CATANEO *et al.*, 2019) e com CHIKV quando comparado com ribavirina até 12hpi (AHMADI *et al.*, 2016), demonstrando que, mesmo com a infecção já estabelecida, o composto ainda é capaz de diminuir a infecção.

O tratamento com naringenina apresenta vantagens, uma vez que também apresenta atividade analgésica e anti-inflamatória (JIN *et al.*, 2017; MANCHOPE *et al.*, 2016; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2016a, 2016b), características importantes no controle da artralgia, um dos principais sintomas observados em pacientes infectados com MAYV (DA SILVA PESSOA VIEIRA *et al.*, 2015). Com menor efeito quando comparado ao controle (ribavirina), o tratamento com crisina apresenta características semelhantes ao tratamento com naringenina. Crisina é descrita como uma droga hepatoprotetora, antialérgica, antiinflamatória, antioxidante, atividades também importantes para controle da sintomatologia desencadeada por infecções por MAYV e outros vírus artritogênicos

(NAZ *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2015; STOMPOR-GORAÇY; BAJEK-BIL; MACHACZKA, 2021).

Com exceção da droga LLA9A, todos os compostos testados apresentam atividade independente do genótipo viral testado. Resultados similares foram observados em estudos com tratamento com naringenina durante infecção dos quatro sorotipos do DENV (FRABASILE *et al.*, 2017) e dois genótipos de ZIKV (CATANEO *et al.*, 2019). Resultados utilizando tratamento com crisina durante infecção de outros arbovírus, como DENV, ZIKA (SUROENGRIT *et al.*, 2017) e CHIKV (POHJALA *et al.*, 2011) corroboram nossos achados com MAYV. Nossos estudos utilizaram duas cepas de MAYV: 1) MAYV\_D é um isolado clínico e 2) a BeAr20290 é uma cepa isolada em 1960 de mosquitos *Haemagogus* (ESPÓSITO; DA FONSECA, 2015). A diferença observada durante o tratamento com o composto LLA9A pode estar relacionada às diferenças entre as cepas, sendo que a cepa BeAr20290 é uma cepa que vem sendo cultivada em diferentes substratos o que pode ter originado mutações adaptativas diferindo da sequência genômica do isolado clínico de MAYV mais recente e conseqüentemente na susceptibilidade ao tratamento (RADIGAN *et al.*, 2015). No entanto, estes dois genótipos são os mais prevalentes em número de casos no mundo e avanços em pesquisa nos compostos anti-MAYV (naringenina e crisina), com ambos são relevantes.

Durante o desenvolvimento do projeto, demonstramos por diversos ensaios que todos os compostos candidatos anti-MAYV (naringenina, LLA9A, crisina e ésterC6) foram capazes de reduzir a infecção e produção de partículas virais infecciosas. Ademais, tratamentos com naringenina e crisina além de controlar a replicação, possuem eficácia para tratar os sintomas relacionados à infecção em pacientes como febre, artralgia constituindo um interessante composto terapêutico durante infecções por MAYV.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente, esse estudo objetivava realizar a triagem antiviral não apenas para infecções por MAYV, mas também pelo vírus Oropouche (OROV). Devido a pandemia de SARS-COV-2 e, uma série de restrições para o desenvolvimento da pesquisa e, o estudo envolvendo OROV foi paralisado. Por se tratar de um vírus negligenciado não há reagentes disponíveis comercialmente que permitam estudos mais aprofundados sobre a biologia e patogênese relacionadas a OROV. Nesse contexto, foram desenvolvidos e caracterizados anticorpos monoclonais dirigidos contra proteínas do OROV (mAbs OROV). No ANEXO II, está apresentado um estudo demonstrando a aplicabilidade dos mAbs OROV em ensaios diagnósticos por IFI e Imunohistoquímica além de indicar que esses reagentes podem ser utilizados para outros estudos relacionados a OROV e como testes de triagem antiviral.

Em relação ao estudo envolvendo MAYV, dois compostos de referência (naringenina e crisina) e, dois compostos derivados (LLA9A e éster C6) apresentaram atividade inibitória da infecção, todos com possível ação nas proteínas nsP responsáveis pela replicação viral. Neste contexto, pretendemos dar prosseguimento aos testes de eficácia e toxicidade em ensaios *in vivo* utilizando camundongos como modelo para os desafios. Adicionalmente, iremos avaliar o mecanismo de ação de cada composto através de *docking* molecular e, dependendo dos resultados, realizar experimentos de cristalografia dos vírus na presença dos compostos utilizados como tratamento, visando determinar a proteína alvo. Além disso, há disponível no laboratório outros compostos aprovados pelo FDA que ainda não foram triados, muitos deles com autorização de uso em humanos concedida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA), permitindo um processo de validação para uso em pacientes mais célere.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, Rana; DELANG, Leen. Antiviral strategies against arthritogenic alphaviruses. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091365>
- ABRAHAM, Vivek C. *et al.* Application of a high-content multiparameter cytotoxicity assay to prioritize compounds based on toxicity potential in humans. **Journal of Biomolecular Screening**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 527–537, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1087057108318428>
- AGUILAR-LUIS, Miguel Angel *et al.* A silent public health threat: emergence of Mayaro virus and co-infection with Dengue in Peru. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05444-8>
- AHMADI, Azin *et al.* Inhibition of chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin. **RSC Advances**, [s. l.], v. 6, n. 73, p. 69421–69430, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6ra16640g>
- ALBULESCU, Irina C. *et al.* Suramin inhibits chikungunya virus replication by interacting with virions and blocking the early steps of infection. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v12030314>
- ALBUQUERQUE, Isabella Gomes Cavalcanti de *et al.* Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 128–129, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000100026>
- ALBUQUERQUE DE OLIVEIRA MENDES, Larissa *et al.* The anti-Zika virus and anti-tumoral activity of the citrus flavanone lipophilic naringenin-based compounds. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 331, n. 109218, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109218>
- AMAYA, Moushimi *et al.* The ubiquitin proteasome system plays a role in Venezuelan equine encephalitis virus infection. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1–24, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124792>
- AMORIM, Raquel *et al.* Thieno[2,3-b]pyridine derivatives: a new class of antiviral drugs against Mayaro virus. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 162, n. 6, p. 1577–1587, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3261-0>
- ANDERSON, Charles R *et al.* Mayaro Virus: A New Human Disease Agent: II. Isolation from Blood of Patients in Trinidad, B.W.I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington VA, USA, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1957. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1012>
- BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim de vigilância laboratorial dos arbovírus. **Boletins Epidemiológico**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 7–18, 2021. Disponível em: <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>
- BRASIL, Ministério da Saúde. Epidemias simultâneas de Mayaro e Febre Amarela em Belterra, Pará. **Boletim Epidemiológico**, [s. l.], v. 10, n. 16, p. 146–152, 1978.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoramento de casos de febre do Mayaro e febre do Oropouche até a Semana Epidemiológica 35, 2019. **Boletim Epidemiológico**, [s. l.], v. 50, n. 28, p. 1–35, 2019.
- BRIOLANT, S. *et al.* In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: Synergistic effect of interferon- $\alpha$  and ribavirin combination. **Antiviral**

**Research**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 111–117, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.09.005>

BROWN, Rebecca S.; WAN, Judy J.; KIELIAN, Margaret. The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 89, p. 1–21, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v10020089>

BRUNINI, S. *et al.* High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1025–1026, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/EID2306.160929>

CAETANO, Camila Carla da Silva *et al.* Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress is Associated With Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51713-9>

CALISHER, Charles H; KARABATSOS, Nick. Arbovirus serogroups: definition and distribution. In: MONATH, Thomas P. (org.). **The arboviruses: epidemiology and ecology**. 1. ed. New york: CRC Press, 1988. p. 19–57.

CALISHER, Charles H.; SHOPE, Robert E.; WALTON, Thomas E. Cell cultures for diagnosis of arbovirus infections in livestock and wildlife. **Journal of Tissue Culture Methods**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 157–163, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01404269>

CARVALHO, Carlos A M *et al.* Inhibition of Mayaro virus infection by bovine lactoferrin. **Virology**, [s. l.], v. 452–453, p. 297–302, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.022>

CASSEB, Alexandre do Rosário *et al.* Arbovírus: Importante Zoonose na Amazônia Brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 9–21, 2013.

CATANEO, Allan Henrique Depieri *et al.* The citrus flavonoid naringenin impairs the in vitro infection of human cells by Zika virus. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52626-3>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008; Miscellaneous Inactivating Agents. **CDC website**, [s. l.], n. May, p. 9–13, 2013. Disponível em: [http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection\\_Sterilization/10\\_0MiscAgents.html](http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/10_0MiscAgents.html)

COFFEY, Lark L *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 155–176, 2013.

COIMBRA, Terezinha Lisieux M. *et al.* Mayaro virus: Imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 221–224, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0036-46652007000400005>

CRUZ, Deu John M. *et al.* High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002073>

CUMMINGS, Kristin J. *et al.* Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon a meta-analysis of randomized trials. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 285, n. 2, p. 193–199, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.285.2.193>

DA COSTA, Vivaldo Gomes *et al.* Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 62, p. 84–85, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.016>

DA SILVA PESSOA VIEIRA, Carla Julia *et al.* Detection of Mayaro virus infections during a

dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 147, p. 12–16, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.020>

DE PAULA SILVEIRA-LACERDA, Elisângela *et al.* Molecular epidemiological investigation of Mayaro virus in febrile patients from Goiânia City, 2017–2018. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 95, n. June, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104981>

DIAGNE, Cheikh Tidiane *et al.* Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 738, p. 1–23, 2020.

DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 51, n. 30, p. 1–6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006791>

DOS SANTOS, Alda E. *et al.* Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-130>

EL-BACHA, Tatiana *et al.* Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 266, n. 1–2, p. 191–198, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049154.17866.00>

ELTAHLA, Auda A *et al.* Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase ; Mode of Action and Resistance. **Viruses**, [s. l.], v. 7, n. September, p. 5206–5224, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v7102868>

ESPÓSITO, Danillo Lucas Alves; DA FONSECA, Benedito Antônio Lopes. Complete genome sequence of Mayaro virus (Togaviridae, Alphavirus) strain BeAr 20290 from Brazil. **Genome Announcements**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 141660, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01372-15>

ESPOSITO, Danillo Lucas Alves; FONSECA, Benedito Antonio Lopes da. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 540–544, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>

FERRAZ, Ariane Coelho *et al.* Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 168, n. December 2018, p. 76–81, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.008>

FERREIRA, Davis F.; REBELLO, Maria Christina Soares. Interferon selectively inhibits the synthesis of Mayaro virus glycoproteins. **Rev. Microbiol.**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 1–10, 1998a. Disponível em: [https://doi.org/S0378-5122\(08\)00341-1](https://doi.org/S0378-5122(08)00341-1) [pii]r10.1016/j.maturitas.2008.11.003

FERREIRA, Davis F.; REBELLO, Maria Christina Soares. INTERFERON SELECTIVELY INHIBITS THE SYNTHESIS OF MAYARO VIRUS GLYCOPROTEINS. **Revista de Microbiologia**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 219–221, 1998b. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0001-37141998000300014>. Acesso em: 10 out. 2018.

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

FRABASILE, Sandra *et al.* The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, p. 43976, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep43976>

FUMAGALLI, Marcilio Jorge *et al.* Chikungunya Virus Exposure Partially Cross-Protects against Mayaro Virus Infection in Mice. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 95, n. 23, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.01122-21>

FUNG, Man *et al.* Evaluation of the Characteristics of Safety Withdrawal of Prescription Drugs from Worldwide Pharmaceutical Markets-1960 to 1999. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 293–317, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/009286150103500134>

GARVEY, Colleen M. *et al.* A high-content image-based method for quantitatively studying context-dependent cell population dynamics. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. July, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep29752>

GO, Yun Young; BALASURIYA, Udeni B. R.; LEE, Chong-kyo. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses : transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, [s. l.], v. 3, p. 58–77, 2014.

GOLDWASSER, Jonathan *et al.* Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. **J Hepatol.**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 963–971, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.011>.Naringenin

GRABARZ, Felipe *et al.* Strategies for the Production of Soluble Interferon-Alpha Consensus and Potential Application in Arboviruses and SARS-CoV-2. **Life**, [s. l.], v. 11, n. 460, p. 1–23, 2021.

GRACI, Jason D.; CAMERON, Craig E. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. **Reviews in Medical Virology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 37–48, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rmv.483>

GULER, Halil Ibrahim *et al.* **Targeting CoV-2 Spike RBD and ACE-2 Interaction with Flavonoids of Anatolian Propolis by in silico and in vitro Studies in terms of possible COVID-19 therapeutics.** [S. l.: s. n.], 2021. *E-book*.

HAHON, N.; ZIMMERMAN, W. D. Chikungunya virus infection of cell monolayers by cell-to-cell and extracellular transmission. **Applied microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 389–391, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.19.2.389-391.1970>

HE, Hongxia *et al.* Synthesis and analgesic activity evaluation of some agmatine derivatives. **Molecules**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 393–402, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401833>

HERMANNNS, Kyra *et al.* Discovery of a novel alphavirus related to Eilat virus. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 43–49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000694>

ISHIDA, Ray *et al.* Mayaro virus non-structural protein 2 circumvents the induction of interferon in part by depleting host transcription initiation factor IIE subunit 2. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10123510>

JIN, Lingtao *et al.* Naringenin Ameliorates Acute Inflammation by Regulating Intracellular Cytokine Degradation. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 199, n. 10, p. 3466–3477, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602016>

KEILER, Annkathrin Martina *et al.* Assessment of the effects of naringenin-type flavanones in uterus and vagina. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 145, p. 49–57, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.001>

KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/b14016-22>

KOISHI, Andrea Cristine *et al.* Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an In Situ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051089>

LANGENDRIES, Lana *et al.* Repurposing drugs for mayaro virus: Identification of eidd-1931, favipiravir and suramin as mayaro virus inhibitors. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040734>

LEDNICKY, John *et al.* Mayaro virus in child with acute febrile illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 2000–2002, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2211.161015>

LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 50, n. 36, p. 1–7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006791>

LIMA, William Gustavo *et al.* Rate of exposure to Mayaro virus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 347–361, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04889-9>

LLAGONNE-BARETS, Marion *et al.* A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 77, p. 66–68, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.013>

LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S2176-62232014000300007>

LORENZ, Camila; RIBEIRO, Ana Freitas; CHIARAVALLLOTI-NETO, Francisco. Mayaro virus distribution in South America. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 198, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105093>

LUCKE, Judith; MUMTSIDU, Eleni. **A Multiparametric Live-Cell Cytotoxicity Analysis using the Operetta**. [S. l.: s. n.], 2009.

MALONIS, Ryan J. *et al.* Near-germline human monoclonal antibodies neutralize and protect against multiple arthritogenic alphaviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 118, n. 37, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2100104118>

MANCHOPE, Marília F. *et al.* Naringenin inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain: Role of oxidative stress, cytokines, Nrf-2 and the no-cGMP-PKG-KATP channel signaling pathway. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1–20, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153015>

MARTIN, H.L. *et al.* **High-content, high-throughput screening for the identification of cytotoxic compounds based on cell morphology and cell proliferation markers**. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088338>

MARTIN, Heather L *et al.* High-Content , High-Throughput Screening for the Identification of Cytotoxic Compounds Based on Cell Morphology and Cell Proliferation Markers. **PLoS one**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1–8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088338>

MARTINEZ, M. G. *et al.* Imaging the Alphavirus Exit Pathway. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 88, n. 12, p. 6922–6933, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.00592-14>

MAVIAN, Carla *et al.* Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07152-5>

MCGILL, Paul E. Viral infections:  $\alpha$ -viral arthropathy. **Baillière's Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 145–150, 1995. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0950-3579\(05\)80151-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0950-3579(05)80151-7)

MELLO, Marcos V.P. *et al.* Antiviral Drug Discovery and Development for Mayaro Fever – What do we have so far? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 921–928, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557520666200316160425>

MOORER, W. R. Antiviral activity of alcohol for surface disinfection. **International journal of dental hygiene**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 138–142, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1601-5037.2003.00032.x>

MOSIMANN, Ana Luiza Pamplona *et al.* A new Aura virus isolate in Brazil shows segment duplication in the variable region of the nsP3 gene. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2907-4>

MOSIMANN, Ana Luiza Pamplona *et al.* Genetic and biological characterization of a densovirus isolate that affects dengue virus infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 285–292, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000300006>

MURALI, Krishnan Saravana *et al.* Anti-chikungunya activity of luteolin and apigenin rich fraction from *Cynodon dactylon*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 352–358, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60343-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60343-6)

MUTRICY, Rémi *et al.* Mayaro virus infection in French Guiana, a cross sectional study 2003–2019. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 99, n. February, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105243>

NAZ, Saima *et al.* Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. **Life Sciences**, [s. l.], v. 235, n. August, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116797>

O'BRIEN, P. J. *et al.* High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 80, n. 9, p. 580–604, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0091-3>

PAHO, Pan American Health Organization; WHO, World Health Organization. Mayaro Fever. **Epidemiological Alert**, [s. l.], n. May, p. 1–5, 2019.

PAREDES, Adriana *et al.* Anti-Sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 108–109, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.26.108>

PEREIRA, Thiago Nunes *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007518>

PEZZI, L. *et al.* GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 3: Epidemiological distribution of Mayaro virus. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 172, n. September, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104610>

PINHEIRO, F P *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, United States, v. 30, n. 3, p. 674–681, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.674>

PINHO-RIBEIRO, Felipe A. *et al.* Naringenin reduces inflammatory pain in mice. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 105, p. 508–519, 2016a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.02.019>

PINHO-RIBEIRO, Felipe A. *et al.* The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-

induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 33, p. 8–14, 2016b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.013>

POHJALA, Leena *et al.* Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. e28923, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028923>

RADIGAN, Kathryn A. *et al.* Modeling human influenza infection in the laboratory. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. 8, p. 311–320, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IDR.S58551>

REBELLO, M. C. *et al.* **Studies on the replication of Mayaro virus grown in interferon treated cells.** [S. l.: s. n.], 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000400019>

ROMEIRO, Marília Farignoli *et al.* Serological evidence of Mayaro virus infection in blood donors from São Carlos, São Paulo, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 114, n. 9, p. 693–696, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa016>

ROTHAN, Hussin A. *et al.* A combination of doxycycline and ribavirin alleviated chikungunya infection. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126360>

SAATKAMP, Cassiano Junior *et al.* Mayaro virus detection in the western region of Pará state, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 54, p. 1–3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0055-2020>

SAJITHA LULU, S. *et al.* **Naringenin and quercetin - Potential anti-HCV agents for NS2 protease targets.** [S. l.]: Taylor & Francis, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1020490>

SÁNCHEZ-SECO, M. P. *et al.* Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. **Journal of Virological Methods**, [s. l.], v. 126, n. 1–2, p. 101–109, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.025>

SÁNCHEZ-SECO, M. Paz *et al.* A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. **Journal of Virological Methods**, [s. l.], v. 95, n. 1–2, p. 153–161, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00306-8](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00306-8)

SLEGERS, C A D *et al.* Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: Is there a risk for attendants to the 2014 FIFA World Cup? **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 317–319, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.04.020>

SOUZA, Leandro Cattelan *et al.* Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 134, p. 22–30, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.04.010>

SPINDOLA, Kassia C.W. *et al.* Anti-Mayaro virus activity of Cassia australis extracts (Fabaceae, Leguminosae). **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0537-z>

STOMPOR- GORAŃY, Monika; BAJEK- BIL, Agata; MACHACZKA, Maciej. Chrysin: Perspectives on contemporary status and future possibilities as pro- health agent. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu13062038>

SU, H.-L.; LIAO, C.-L.; LIN, Y.-L. Japanese Encephalitis Virus Infection Initiates Endoplasmic Reticulum Stress and an Unfolded Protein Response. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 76, n. 9, p. 4162–4171, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4162-4171.2002>

SUGASTI-SALAZAR, Madelaine *et al.* Targeting Host PIM Protein Kinases Reduces MayaroVirus Replication. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 422, p. 1–13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-012361160-4/50059-1>

SUROENGRIT, Aphinya *et al.* Halogenated Chrysin Inhibits Dengue and Zika Virus Infectivity. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14121-5>

THEILACKER, Christian *et al.* Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 2011–2014, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-369>

TRAVASSOS DA ROSA, APA *et al.* Arbovirus research in the Brazilian Amazon. **Arbovirus research in Australia - Proceedings 5th Symposium**, [s. l.], p. 4–8, 1989.

TUTUNCHI, Helda *et al.* Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 3137–3147, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6781>

UFRJ. UFRJ detecta vírus Mayaro no estado do Rio de Janeiro. <https://ufrj.br/noticia/2019/05/16/ufrj-detecta-virus-mayaro-no-estado-do-rio-de-janeiro>, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://ufrj.br/noticia/2019/05/16/ufrj-detecta-virus-mayaro-no-estado-do-rio-de-janeiro>

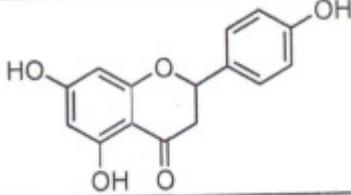
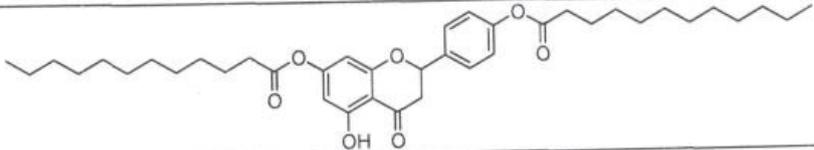
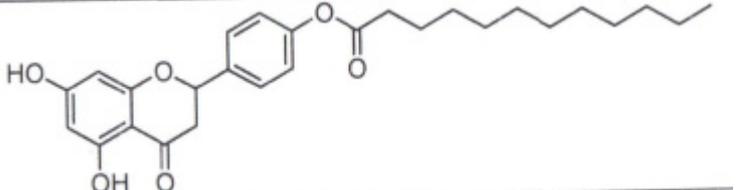
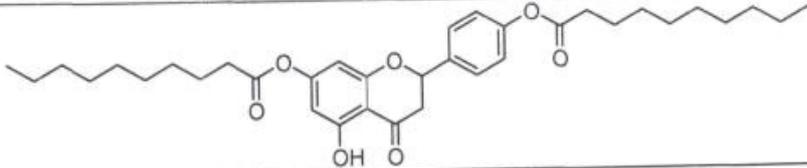
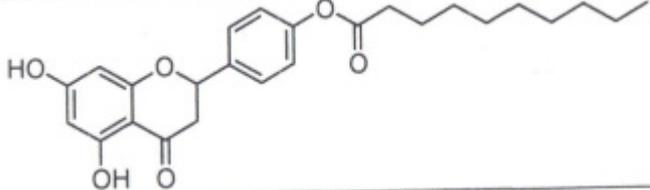
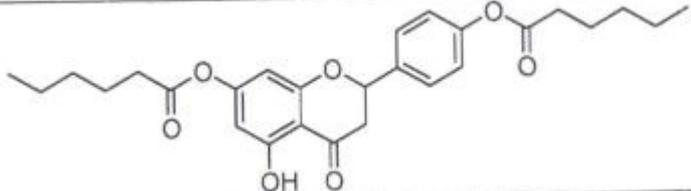
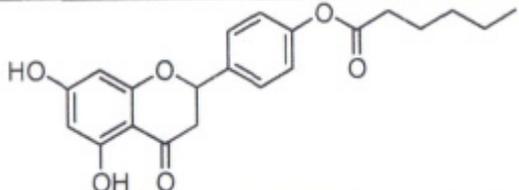
WEBB, Emily M. *et al.* Effects of Chikungunya virus immunity on Mayaro virus disease and epidemic potential. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56551-3>

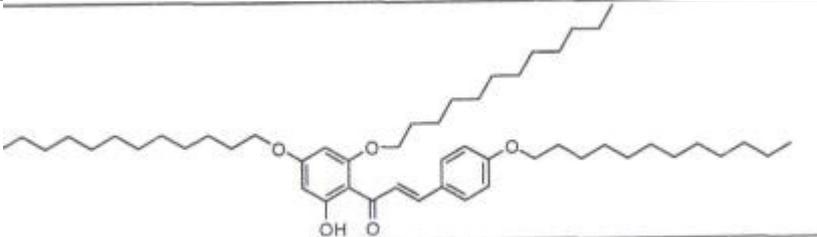
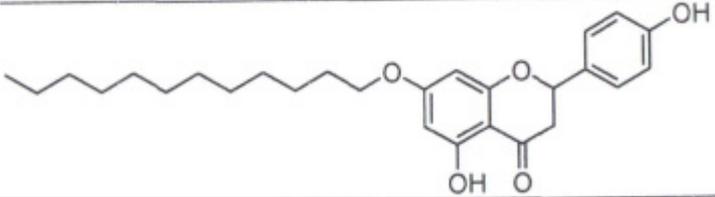
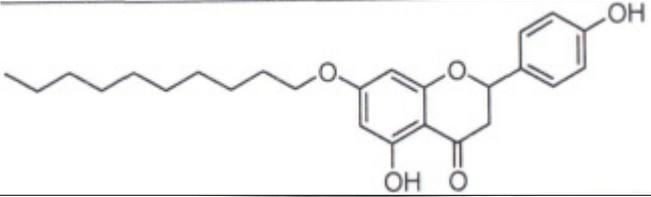
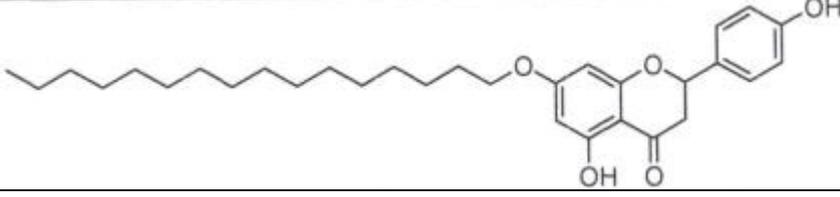
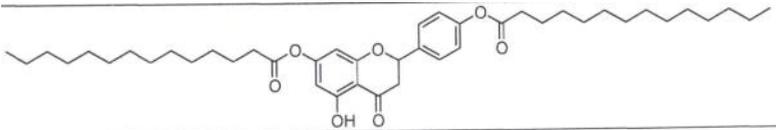
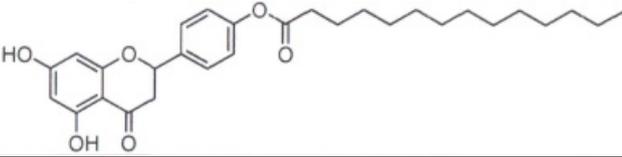
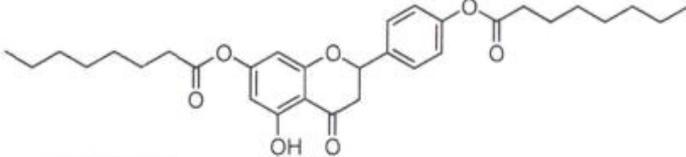
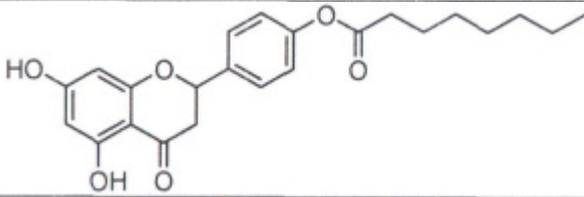
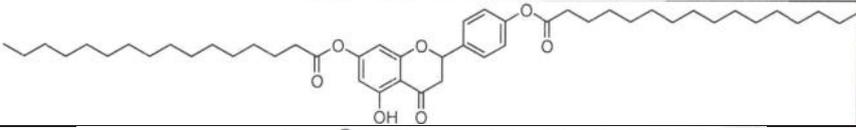
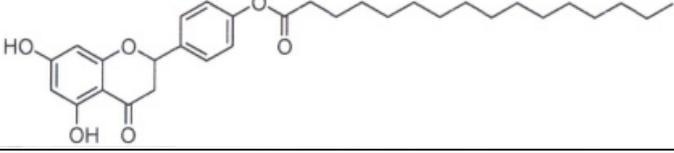
ZANDI, Keivan *et al.* Flavone enhances dengue virus type-2 (NGC strain) infectivity and replication in Vero cells. **Molecules**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 2437–2445, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules17032437>

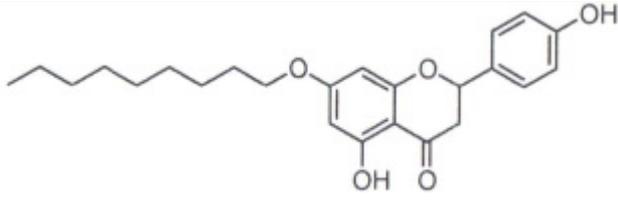
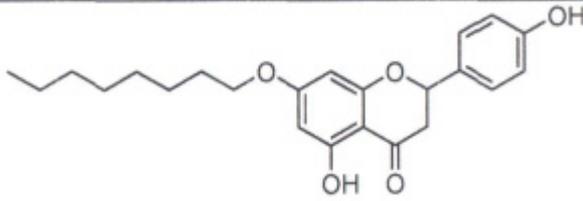
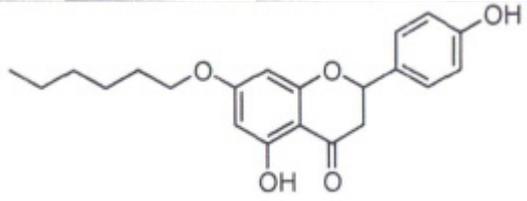
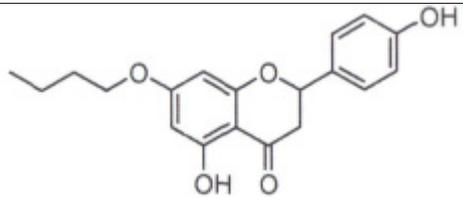
ZANELLO, Paula Rodrigues *et al.* Quinic acid derivatives inhibit dengue virus replication in vitro. **Virology Journal**, [s. l.], v. 12, n. 223, p. 1–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0443-9>

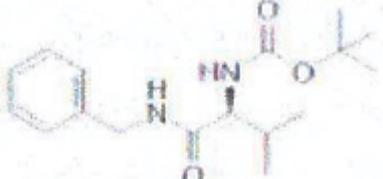
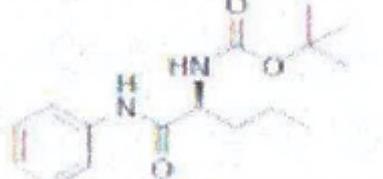
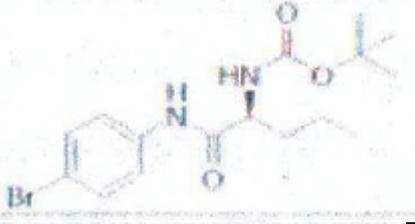
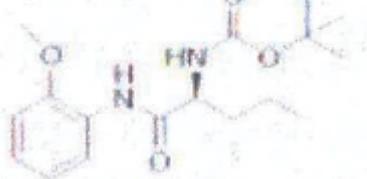
ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>

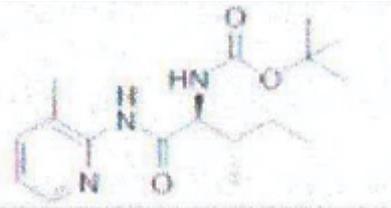
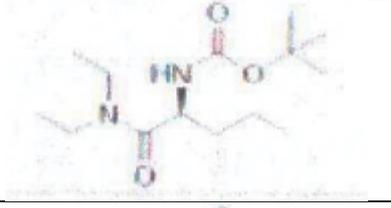
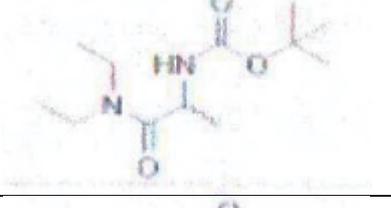
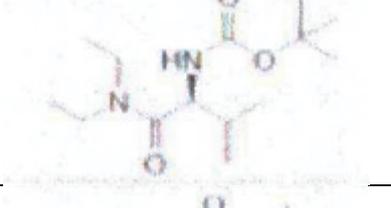
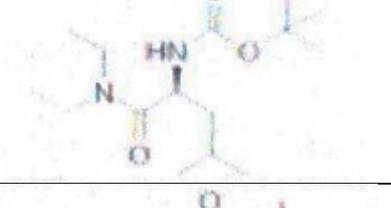
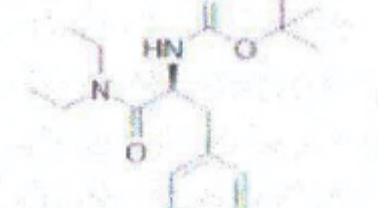
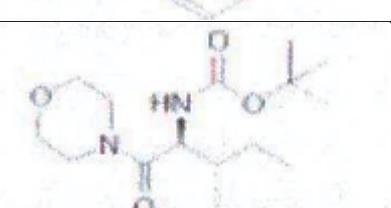
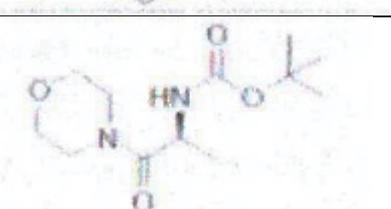
10. ANEXO I – LISTA DE COMPOSTOS TRIADOS DERIVADOS DE NARINGENINA, CRISINA, CARBAMATOS E COMPOSTOS DA BIBLIOTECA TOCRISCREEN (FDA).

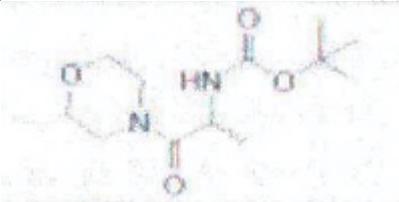
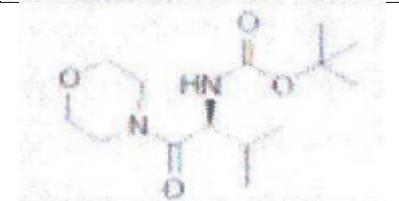
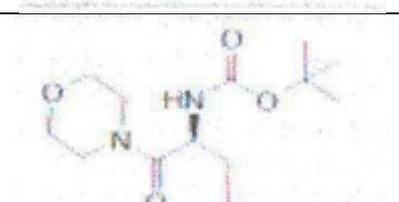
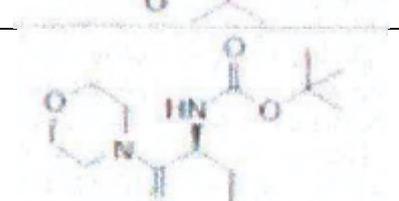
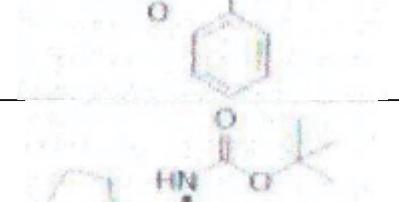
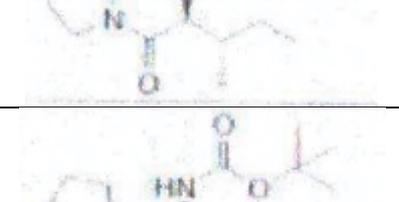
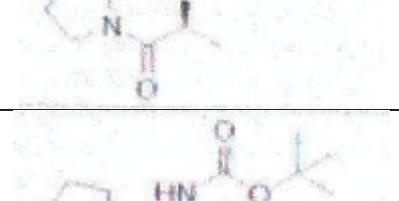
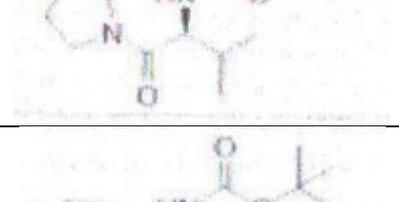
Compostos derivados do flavonoide (flavonona) naringenina (ALBUQUERQUE DE OLIVEIRA MENDES <i>et al.</i> , 2020)		
Código da amostra	Estrutura dos compostos	Massa molar
Naringenina		272,25 g/mol
LLA4A		636,86 g/mol
LLA4B		454,55 g/mol
LLA5A		580,75 g/mol
LLA5B		426,5 g/mol
CSP1A		468,54 g/mol
CSP1B		370,39 g/mol

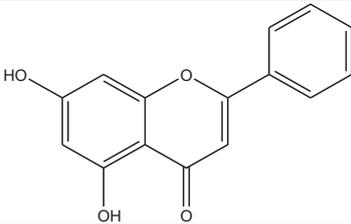
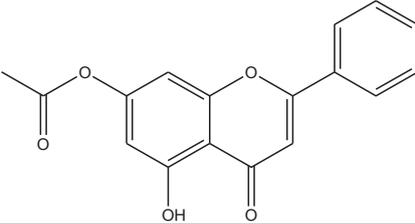
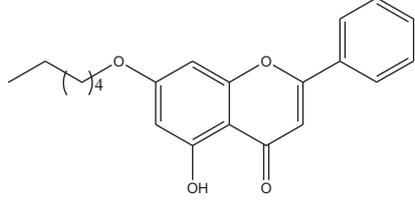
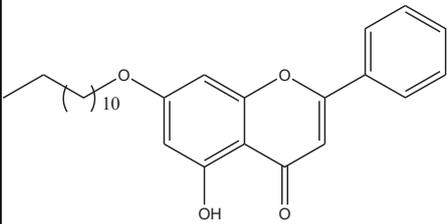
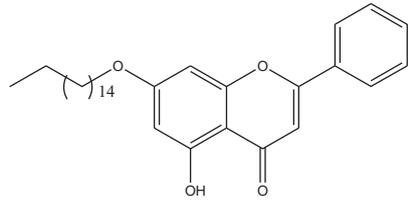
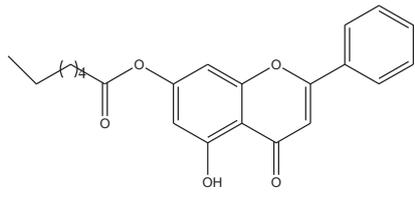
CSP7A		777,21 g/mol
LLA7B		440,57 g/mol
LLA8B		412,52 g/mol
LLA9A		496,68 g/mol
LLA10A		692,96 g/mol
LLA10B		482,61 g/mol
LLA11A		524,6 5 g/mol
LLA11B		398,45 g/mol
LLA12A		749,07 g/mol
LLA12B		510,66 g/mol

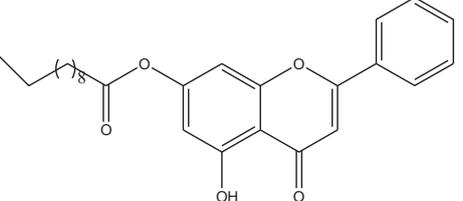
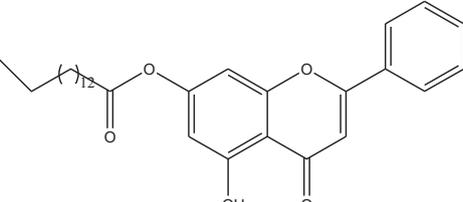
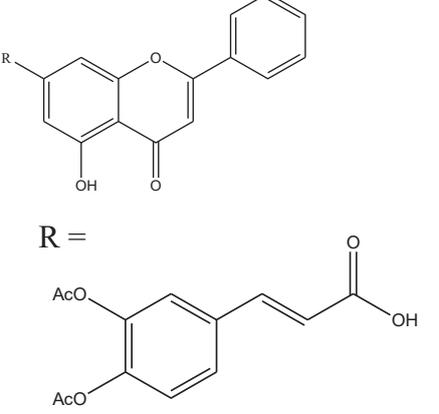
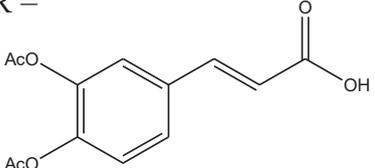
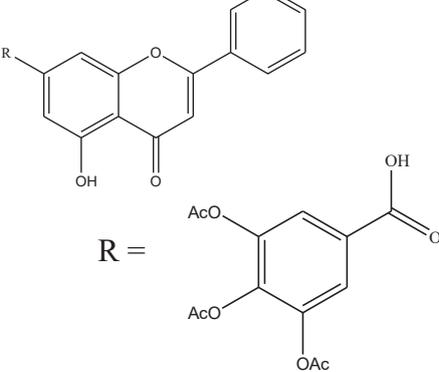
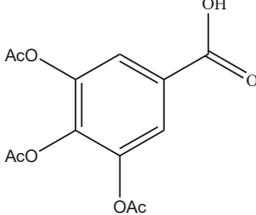
CSP2B		398,49 g/mol
CSP3B		384,47 g/mol
CSP4B		356,41 g/mol
CSP5B		328,36 g/mol

Compostos carbamatos		
Código	Estrutura	Massa Molar
PPC140		306,40 g/mol
PPC81		306,40 g/mol
PPC97		385,30 g/mol
PPC96		336,43 g/mol

PPC105		321,42 g/mol
PPC88		286,42 g/mol
PPC111		244,36 g/mol
PPC138		272,39 g/mol
PPC141		286,42 g/mol
PPC145		320,43 g/mol
PPC87		300,39 g/mol
PPC107		258,32 g/mol

PPC110		258,32 g/mol
PPC139		286,37 g/mol
PPC142		300,39 g/mol
PPC123		334,42 g/mol
PPC116		284,40 g/mol
PPC117		242,32 g/mol
PPC146		270,37 g/mol
PPC120		318,42 g/mol

<b>Compostos derivados do flavonoide (flavona) crisina</b>		
<b>Código da amostra</b>	<b>Estrutura dos compostos</b>	<b>Massa molar (g/mol)</b>
Crisina		254
Acetato crisina		296
Éter C6 crisina		478
Éter C12 crisina		422
Éter C16 crisina		478
Éster C6 crisina		352

Éster C10 crisina		408
Éster C14 crisina		482
Cafeoil crisina	 <p>R =</p> 	532
Benzoato crisina	 <p>R =</p> 	358

<b>#5932 Tocriscreen FDA-Approved Compounds - Testados</b>				
<b>Cat.No</b>	<b>Product Name</b>	<b>Brief Description</b>	<b>Concentration / Solvent</b>	<b>Product Data Sheet</b>
0425	UK 14,304	alpha2 agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0425</a>
0427	Bromocriptine mesylate	Selective D2-like agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0427</a>
0475	Dihydroergotamine mesylate	Partial alpha agonist. Non-selective	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0475</a>
0515	Dobutamine hydrochloride	alpha1, beta1 and beta2 agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0515</a>
0685	Diltiazem hydrochloride	Ca <sup>2+</sup> channel blocker (L-type)	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0685</a>
0694	Pilocarpine hydrochloride	Muscarinic agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0694</a>
0869	Felbamate	NMDA antagonist, acts glycine site	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0869</a>
0902	Cimetidine	H2 antagonist, I1 agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0902</a>
0909	Tropicamide	Selective M4 muscarinic antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0909</a>
0911	Glibenclamide	Kir6 (KATP) channel blocker	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0911</a>
0999	Tamoxifen citrate	Estrogen receptor partial agonist/antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_0999</a>
1097	Taxol	Promotes assembly and inhibits disassembly of mi	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1097</a>
1226	Etoposide	Topoisomerase II inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1226</a>
1328	Flumazenil	Benzodiazepine antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1328</a>
1453	Clemastine fumarate	H1 antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1453</a>
1470	Flecainide acetate	Cardiac Na <sup>+</sup> channel blocker. Antiarrhythmic	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1470</a>
1530	Lovastatin	Potent HMG-CoA reductase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1530</a>
1692	Cilostazol	PDE3A inhibitor. Also adenosine uptake inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1692</a>
1706	Acetaminophen	Cyclooxygenase inhibitor; may be selective for CO	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1706</a>
1944	Loratidine	Peripheral H1 antagonist; antiallergic agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1944</a>
1965	Simvastatin	HMG-CoA reductase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_1965</a>

2004	Isradipine	Ca <sup>2+</sup> channel blocker (L-type)	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2004</a>
2175	Tetrabenazine	Potent inhibitor of vesicular monoamine transpor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2175</a>
2280	Raloxifene hydrochloride	Selective estrogen receptor modulator (SERM)	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2280</a>
2429	Fexofenadine hydrochloride	H1 receptor antagonist; non-sedating antiallergic	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2429</a>
2513	Acyclovir	Inhibits viral DNA polymerase; antiherpetic agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2513</a>
2571	Amlodipine besylate	Ca <sup>2+</sup> channel blocker (L-type)	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2571</a>
2578	Benazepril hydrochloride	Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2578</a>
2624	Decitabine	DNA methyltransferase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2624</a>
2664	Cabergoline	Selective D2-like agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2664</a>
2673	Acarbose	Glucosidase alpha inhibitor (intestinal)	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2673</a>
2682	Sodium 4-Phenylbutyrate	Histone deacetylase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2682</a>
2685	Carvedilol	beta-adrenoceptor and alpha1-adrenoceptor anta	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2685</a>
2688	CPT 11	DNA topoisomerase I inhibitor; antitumor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2688</a>
2796	(S)-(+)-Ibuprofen	Cyclooxygenase inhibitor (COX-1 > COX-2)	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2796</a>
2839	Levetiracetam	Antiepileptic; binds SV2A	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2839</a>
2864	Metformin hydrochloride	Activator of LKB1/AMPK; antidiabetic agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2864</a>
2917	Venlafaxine hydrochloride	Dual serotonin/noradrenalin re-uptake inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2917</a>
2960	Felodipine	Ca <sup>2+</sup> channel blocker (L-type)	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2960</a>
2964	Doxazosin mesylate	alpha1 antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2964</a>
3016	Miconazole nitrate	Antifungal agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3016</a>
3108	Bumetanide	Na <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> /K <sup>+</sup> (NKCC) symporter inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3108</a>
3118	Ranolazine dihydrochloride	Antianginal, activates pyruvate dehydrogenase	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3118</a>
3256	Metoprolol tartrate	Selective beta1 antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3256</a>
3259	Gemcitabine hydrochloride	DNA synthesis inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3259</a>

3287	Prochlorperazine dimaleate	D2 receptor antagonist. Also 5-HT3 and nAChR an	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 3287</a>
3309	Fluvastatin sodium	Potent HMG-CoA reductase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 3309</a>
3388	Anastrozole	Potent aromatase (CYP19) inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 3388</a>

<b>#5932 Tocriscreen FDA-Approved Compounds – Não testados</b>				
<b>Cat.No</b>	<b>Product Name</b>	<b>Brief Description</b>	<b>Concentration / Solvent</b>	<b>Product Data Sheet</b>
0583	Minoxidil	Kir6 channel (KATP) opener	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 0583</a>
0623	Prazosin hydrochloride	alpha1 and alpha2B antagonist. MT3 antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 0623</a>
0691	Dipyridamole	Adenosine transport inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 0691</a>
0713	Cyclothiazide	AMPA selective desensitization inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 0713</a>
0937	Pimozide	D2-like antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 0937</a>
0964	Diazoxide	Blocks desensitization of AMPA receptors	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 0964</a>
1047	ICI 182,780	Estrogen receptor antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 1047</a>
1126	Dexamethasone	Anti-inflammatory glucocorticoid	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 1126</a>
1479	Mifepristone	Progesterone and glucocorticoid receptor antagonon	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 1479</a>
1505	Mycophenolic acid	Inosine monophosphatase dehydrogenase inhibit	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 1505</a>
1637	Argatroban	Potent thrombin inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 1637</a>
1695	Cisapride	5-HT4 agonist; stimulates intestinal ACh release	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 1695</a>
2007	Fluticasone propionate	Selective high affinity glucocorticoid receptor ago	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 2007</a>
2018	Mirtazapine	Potent 5-HT2 antagonist. Also 5-HT3, H1 and alph	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 2018</a>
2252	Doxorubicin hydrochloride	Antitumor antibiotic agent. Inhibits DNA topoisom	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 2252</a>
2395	Sertraline hydrochloride	5-HT re-uptake inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 2395</a>
2596	Mexiletine hydrochloride	Na+ channel blocker; antiarrhythmic agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 2596</a>
2600	Clofarabine	Deoxycytidine kinase (dCK) substrate	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet 2600</a>

2625	Zonisamide	Blocks voltage-sensitive Na <sup>+</sup> and Ca <sup>2+</sup> channels (T	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2625</a>
2671	Budesonide	Synthetic glucocorticoid; anti-inflammatory and c	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2671</a>
2706	Temozolomide	DNA-methylating antitumor agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2706</a>
2749	Dexmedetomidine hydrochloride	Potent, highly selective alpha2 agonist. Active iso	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2749</a>
2831	Bupropion hydrochloride	Non-selective inhibitor of dopamine and noradren	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2831</a>
2852	Adapalene	RARbeta and RARgamma agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2852</a>
2968	Spironolactone	Mineralocorticoid receptor antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_2968</a>
3000	Iressa	Orally active, selective EGFR inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3000</a>
3050	Tamsulosin hydrochloride	Selective alpha1A antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3050</a>
3109	Furosemide	Na <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> /K <sup>+</sup> (NKCC) symporter inhibitor. Also anta	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3109</a>
3292	Metyrapone	11-beta hydroxylase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3292</a>
3308	Zileuton	Orally active 5-LOX inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3308</a>
3351	NS 304	Selective prostacyclin IP1 receptor agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3351</a>
3389	Bicalutamide	Non-steroidal androgen receptor antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3389</a>
3495	Fludarabine	Purine analog; inhibits DNA synthesis	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3495</a>
3517	Nebivolol hydrochloride	Highly selective beta1-adrenoceptor antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3517</a>
3586	Sumatriptan succinate	5-HT1A/1B/1D receptor agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3586</a>
3609	Tizanidine hydrochloride	alpha2 agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3609</a>
3620	Topiramate	GluR5 antagonist; inhibits carbonic anhydrase (CA	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3620</a>
3737	Asenapine maleate	Novel antipsychotic agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3737</a>
3756	Maraviroc	Selective CCR5 antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3756</a>
3757	Dofetilide	KV11.1 (hERG) channel blocker; inhibits rapid dela	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3757</a>
3759	Exemestane	Steroidal aromatase (CYP19) inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3759</a>
3761	Tolterodine L-tartrate	Potent, non-selective muscarinic receptor antago	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3761</a>

3765	Linezolid	Antibiotic; inhibits protein synthesis in gram-posit	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3765</a>
3768	Sunitinib malate	Potent VEGFR, PDGFRbeta and KIT inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3768</a>
3771	Azithromycin	Antibiotic; inhibits 50S ribosomal subunit formatio	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3771</a>
3784	Sildenafil citrate	Orally active, potent PDE5 inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3784</a>
3786	Celecoxib	Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3786</a>
3798	Losartan potassium	Selective, non-peptide AT1 antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3798</a>
3805	Repaglinide	Kir6 (KATP) channel blocker	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3805</a>
3842	5-Azacytidine	DNA methyltransferase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3842</a>
3852	Tranylcypromine hydrochloride	Irreversible inhibitor of LSD1; also inhibits MAO	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3852</a>
3862	Eletriptan hydrobromide	Orally active, selective 5-HT1B/1D agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3862</a>
3863	Trovafoxacin mesylate	Antibiotic; inhibits bacterial DNA synthesis	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3863</a>
3896	Rotigotine hydrochloride	Dopamine D2/D3 agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3896</a>
3908	Ibutilide hemifumarate	Blocks IKr, hERG and L-type Ca2+ channels; class II	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3908</a>
3918	Pyrimethamine	Potent inhibitor of multi-drug and toxin extrusion	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_3918</a>
4092	Aspirin	Cyclooxygenase inhibitor; NSAID	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4092</a>
4093	Hydrocortisone	Adrenal glucocorticoid; immunosuppressant	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4093</a>
4094	Flutamide	Non-steroidal androgen receptor antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4094</a>
4096	Clotrimazole	Cytochrome P450 inhibitor; antifungal	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4096</a>
4098	Carbamazepine	Inhibitor of neuronal voltage-gated Na+ channels;	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4098</a>
4099	Azathioprine	Purine analog; prodrug of 6-mercaptopurine (Cat.	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4099</a>
4102	Mycophenolate mofetil	Inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4102</a>
4107	Probenecid	MRP inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4107</a>

4113	Fenofibrate	PPARalpha agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4113</a>
4117	Bepriidil hydrochloride	Non-selective calcium channel blocker	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4117</a>
4124	Pioglitazone hydrochloride	Selective PPARgamma agonist; antidiabetic agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4124</a>
4148	Abacavir hemisulfate	Reverse transcriptase inhibitor; antiretroviral	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4148</a>
4149	Delavirdine mesylate	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4149</a>
4216	Valsartan	High affinity, selective AT1 antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4216</a>
4231	Nateglinide	Kir6 (KATP) blocker; displays high affinity for SUR1	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4231</a>
4241	Olopatadine hydrochloride	H1 antagonist; ocular antiallergic agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4241</a>
4245	Meclizine dihydrochloride	Human pregnane X receptor agonist; H1 antagoni	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4245</a>
4256	Tiagabine hydrochloride	GABA uptake inhibitor; anticonvulsant	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4256</a>
4308	Rasagiline mesylate	Selective, irreversible MAO-B inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4308</a>
4349	Olanzapine	5-HT2A/D2 antagonist; atypical antipsychotic	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4349</a>
4350	Axitinib	Potent VEGFR-1, -2 and -3 inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4350</a>
4361	Bosutinib	Dual Src-Abl inhibitor; antiproliferative	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4361</a>
4382	Letrozole	Potent, reversible non-steroidal aromatase inhibit	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4382</a>
4418	Saquinavir mesylate	HIV protease inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4418</a>
4427	Febuxostat	Xanthine oxidase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4427</a>
4440	Rivastigmine tartrate	Dual AChE and BChE inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4440</a>
4460	Trifluorothymidine	Thymidylate synthase inhibitor; induces DNA frag	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4460</a>
4501	Ribavirin	Antiviral guanosine analog; blocks eIF4E activity	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4501</a>
4553	Azilsartan	Potent AT1 receptor inverse agonist; antihyperten	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4553</a>
4616	Olmesartan	Potent AT1 antagonist; metabolite of Olmesartan	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4616</a>
4652	SAHA	Class I and II HDAC inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4652</a>
4657	Zolmitriptan	Potent 5-HT1B/1D/1F agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4657</a>
4712	Salmeterol xinafoate	Long-acting beta2 agonist; bronchodilator	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4712</a>

4735	Quetiapine hemifumarate	5-HT <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> antagonist; atypical antipsychotic	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4735</a>
4791	Candesartan	AT <sub>1</sub> receptor antagonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4791</a>
4796	Escitalopram oxalate	Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4796</a>
4798	(S)-Duloxetine hydrochloride	Potent 5-HT and NA reuptake inhibitor; also block	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4798</a>
4799	Capecitabine	Prodrug of 5-Fluorouracil (Cat. No. 3257). Inhibits	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4799</a>
4819	Methylprednisolone	Glucocorticoid receptor agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4819</a>
4833	Levonorgestrel	Synthetic progesterone analog	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4833</a>
4857	Amlexanox	Inhibitor of TBK1 and IKKepsilon; antiallergic agent	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4857</a>
4935	Sulfasalazine	Inhibitor of NF-kappaB activation; also inhibits SX	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4935</a>
4942	Pitavastatin calcium	HMG-CoA reductase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4942</a>
4985	Miglitol	alpha-glucosidase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4985</a>
4990	Stavudine	Nucleoside analog; antiviral	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_4990</a>
5069	Teriflunomide	Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5069</a>
5136	Rizatriptan benzoate	Potent 5-HT <sub>1B/1D</sub> agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5136</a>
5139	Telmisartan	AT <sub>1</sub> antagonist; PPARgamma partial agonist	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5139</a>
5181	Tolvaptan	Potent and selective vasopressin V <sub>2</sub> receptor anta	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5181</a>
5250	Ramipril	Non-peptide, competitive angiotensin-converting	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5250</a>
5263	Bazedoxifene acetate	Potent and selective estrogen receptor modulator	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5263</a>
5325	Rosiglitazone	Potent and selective PPARgamma agonist; antidia	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5325</a>
5422	XL 184	Potent VEGFR inhibitor; also inhibits other RTKs	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5422</a>
5491	Aliskiren hemifumarate	Potent renin inhibitor; antihypertensive	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5491</a>
5584	Aripiprazole	High affinity D <sub>2</sub> and 5-HT <sub>1A</sub> receptor partial agoni	10mM DMSO solution	<a href="#">Datasheet_5584</a>

**11. ANEXO II – DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF THE FIRST  
MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST OROPOUCHE VIRUS**

**Development of monoclonal antibodies against Oropouche Virus and its  
applicability to immunohistochemistry diagnosis**

Ana Paula Andreolla<sup>1</sup>; Alessandra Abel Borges<sup>2</sup>; Seigo Nagashima<sup>3</sup>, Caroline Busatta Vaz de Paula<sup>3</sup>, Lucia de Noronha<sup>3</sup> Juliano Bordignon<sup>1\*</sup>; Claudia Nunes Duarte dos Santos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial de Curitiba, Curitiba, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, Maceió, Alagoas, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, Curitiba, Paraná, Brazil.

\*Corresponding authors: [juliano.bordignon@fiocruz.br](mailto:juliano.bordignon@fiocruz.br) (J. Bordignon),

[claudia.dossantos@fiocruz.br](mailto:claudia.dossantos@fiocruz.br) (C.N. Duarte dos Santos).

## Abstract

Oropouche virus (OROV), the causative agent of Oropouche Fever, is broader dispersed in Brazil and South America regions causing sporadic outbreaks. Due to the undifferentiated initial clinical symptoms caused by OROV and by other arboviruses that geographically overlap, the differential diagnosis is challenging. As for most of the neglected tropical diseases, there are a lack of reagents for diagnosis and to study viral pathogenesis. In this context, we generated and characterized a panel of mouse monoclonal antibodies that recognizes OROV antigens in Indirect Immunofluorescent Assay (IFA) and Immuno-Histochemistry (IHC) assays. Considering that it is the first monoclonal antibody produced for the detection of OROV infections, we evaluate that it will be useful not only for diagnostic purposes but also for serological surveys and epidemiological surveillance on the dispersion and prevalence of OROV in Brazil and South America region.

## 1. Introduction

Oropouche virus (OROV) is the etiological agent of a neglected emerging zoonotic disease named Oropouche fever, which is transmitted to humans mostly by the biting of *Culicoides paraensis*<sup>1</sup>. In Brazil, since the isolation of OROV in 1960<sup>2</sup>, several outbreaks of human disease were initially reported in the states of Pará, and later reached other states in the northern region of the country, such as Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão and Rondônia<sup>3,4</sup>. After a long period without OROV disease notification, in 2006, the virus reemerged in the states of Pará and Amazonas and it came to be considered one of the most prevalent arboviruses in the Brazilian Amazon<sup>5,6</sup>, prior to the emergence of the Zika virus and Chikungunya virus in Brazil.

OROV is a member of the genus *Orthobunyavirus*, family *Peribunyaviridae* and is classified into four genotypes, all found in Brazil<sup>7,8</sup>. The viral particle is spherical with approximately 60 nm in diameter and a genome containing three negative segments of single-stranded genomic RNA (Small (S), Medium (M) and Large (L)) surrounded by helical nucleocapsids. Each segment encodes different proteins, the nucleocapsid (N; 26,26 KDa) and nonstructural protein s (NSs;

10,65KDa) by the S segment, two structural surface glycoproteins (Gn with 28,03KDa and Gc with 107,14KDa) and one nonstructural protein m (NSm; 26,65KDa) by the M segment, and the RNA-dependent RNA polymerase (261,25 KDa) by the L segment<sup>9–13</sup>.

The clinical presentations are usually confused with other arboviruses that co-circulate in the endemic areas, such as dengue and yellow fever. Oropouche fever is described as acute febrile illness common associated with headaches, fever, myalgia and skin rash<sup>2</sup>. Neural pathways of infection might occur, resulting in rare cases of neurological syndromes and severe systemic infections, however, the prognosis is good and there are no reports of sequelae resulting from the infection<sup>14–17</sup>. No licensed vaccines are currently available and the treatment for Oropouche fever consists of symptoms relief using antipyretic and analgesics<sup>18</sup>. The clinical diagnostic is normally confused with dengue virus, because they have similar symptoms, and the laboratory diagnostic consists of molecular techniques (RT-PCR), and viral isolation in cultured cells which are limited to the viremic phase<sup>19–21</sup>.

Polyclonal and monoclonal antibodies (mAbs) are essential tools widely used in the serological diagnosis of diseases caused by microorganisms, including viral infections<sup>22–24</sup>. Additionally, mAbs are more specific than polyclonal antibodies, reducing issues in the interpretation of results, and facilitating the standardization and reproducibility of the assays<sup>25</sup>. This reagent is also essential for epidemiological surveillance, differential diagnostic and pathogenesis studies<sup>25</sup>. Additionally, mAbs have also therapeutic properties and could eventually be used in immunotherapy as already demonstrated for other virus infections<sup>26</sup>. In this study, we describe the development and characterization of mouse mAbs against a Brazilian strain of OROV and demonstrated its applicability as a diagnostic reagent in IHC assays.

## **2. Animals and Methods**

### **Cell line and viruses**

C6/36 *Aedes albopictus* cells (ATCC CRL-1660) were grown in Leibovitz's L15 medium (Gibco, Grand Island, USA) supplemented with 5% fetal bovine sera (FBS-Gibco), 25 µg/ml gentamicin (Gibco) and 0.27% tryptose at 28°C. Vero E6 cells (Sigma, 85020206), A549 (ATCC CCL-185), Huh-7.5 (ATCC PTA-8561) e

A172 (ATCC CRL-1620) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Ham F12 (DMEM F12 – Gibco) with 10% FBS, 14 mM sodium bicarbonate, 100 IU/ml penicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Mouse myeloma cell line P3x63Ag8.653 (kindly supplied by Dr. Carlos R. Zanetti, from Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ATCC CRL-1580) and hybridomas were maintained in RPMI-1640 medium (Cultilab, Campinas, Brazil) with 20% FBS, 23.8 mM sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 9.6 mM HEPES, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B (Sigma-Aldrich) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. THP-1 (ATCC TIB-202) and THP-1-derived macrophages were maintained in RPMI-1640 medium (Cultilab, Campinas, Brazil) with 10% FBS, 23.8 mM sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 9.6 mM HEPES, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B (Sigma-Aldrich) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and differentiation was induced with 100 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA) for 48h.

OROV is a clinical isolate kindly supplied by Dr. Felipe Gomes Naveca<sup>27</sup>, previously allocated in Virology Molecular Laboratory (Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Brazil), was amplified in Vero E6 and titrated by the plaque-forming assay in C6/36<sup>28</sup>.

#### Immunization protocol

Tree 30 day-old BALB/c mice were immunized five times (14 days apart) with  $1 \times 10^6$  pfu<sub>C6/36</sub>/dose/animal of OROV mixed with Alu-S-Gel (Serva, Heidelberg, Germany) in the doses 1 to 4 (intraperitoneal route) and no adjuvant in the fifth dose (intravenous route) (Figure 1A). Blood samples were collected prior to first immunization (pre-immune sera) and after fourth immunization by puncturing the caudal vein. The experimental protocol for animal use were approved by the Ethical Committee on Animal Research of the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz CEUA n° LW-27/19).

#### Production of mAb

Three days after the fifth dose, the mice were anesthetized via intraperitoneal route with 100 mg/kg ketamine/20 mg/kg xylazine and, the final bleeding was performed by cardiac puncture to obtain post-immune sera. After the bleeding mice were euthanized with an overdose of ketamine (500 mg/kg) and xylazine (100 mg/kg) and their spleens were removed aseptically. The splenocytes were separated and fused with P3x63Ag8.653 cells using polyethylene glycol (MW 3000-3700; Sigma-Aldrich), as previously described<sup>23</sup>. The resulting hybrid cells were maintained in RPMI-1640 media and the selection of hybrid cells (myeloma + splenocytes) were made using HAT supplement (100 µM hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin and 16 µM thymidine; Sigma-Aldrich) for 14 days, followed by 4 days in HT supplement media (100 µM hypoxanthine and 16 µM thymidine). After selection in HAT/HT media hybrid cells were maintained in RPMI media as already described<sup>23</sup>.

#### Hybridoma screening with immunofluorescence assay

Hybridomas that were secreting anti-OROV antibody were selected by indirect immunofluorescence (IFA) on OROV-infected C6/36 cells and uninfected C6/36 as control (MOCK). Briefly  $1 \times 10^4$  C6/36 cells/well (96-well plates) were infected with OROV at a multiplicity of infection (MOI) of 1, fixed 48h post-infection with methanol:acetone (v/v) overnight at  $-20^{\circ}$ . Thus, after the fixative reagent was discarded and plates dried in the air, 100 µl of hybridoma cell culture supernatants were added in each well and incubated for 1h at  $37^{\circ}\text{C}$ . After washing three times with PBS (1x Phosphate Buffered Saline) plus 0.05% Tween 20, an anti-mouse alexa fluor 488-conjugated antibody (1:1000; Sigma-Aldrich) and 0,3 mM DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) diluted in PBS-BSA 1% (Bovine Sera Albumine) were used to stain cells secreting antibodies against OROV virus. After 1h incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  cells were washed again 3x using PBS and 100 µl of PBS were added in each well for microscopy analysis. The polyclonal serum was used as positive controls and pre-immune sera as a negative control. The immunofluorescence images were captured with Operetta CLS High-Content Analysis System (PerkinElmer, Massachusetts, USA) using a 20x non-confocal objective and analyzed using the Harmony Software (PerkinElmer).

Clones that reacted with infected cells and did not react with MOCK controls were subjected to limiting dilutions (LD) to have a single cell per well. Upon reaching 75% confluence, the IFA was performed again, and the clones that still recognize OROV antigens in C6/36 infected cells were subjected to a second round of limiting dilution. Once reactivity was confirmed after two cycles of LD, isotyping was performed by immunoassay with a commercial kit (Southern Biotech), according to the manufacturer's recommendations, and the hybridoma were expanded to produce mAb and the cells were freeze for future use.

#### Target protein of mAb anti-OROV

The specificity of mAb to OROV proteins was investigate using Western Blot assay. Supernatant of Vero E6 infected by OROV at a MOI 0.001 was concentrated by polyethylene glycol precipitation using 7% at final concentration of PEG 8000 and purified by sedimentation through a 30%/60% sucrose cushion in TNE (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA). The cell extract was lysed (0.1% Triton-X, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol), centrifuged at 2,000 rpm for 1 minute and the supernatant was collected and stored at -80°C. Purified viral supernatant, infected cell lysate and uninfected (MOCK) were then diluted in Laemmli sample buffer (1:1), boiled for 10 minutes and loaded into 13% SDS-Page gels<sup>22,29</sup>.

#### Immunohistochemistry assay

To evaluate the effectiveness of the mAbs produced in immunohistochemistry assay, we intracranially inoculated 300 PFU of OROV in 3 newborn BALB/C mice (first 48h of life) or vehicle (MOCK). After 3 days, animals were euthanatized using an overdose of ketamine (500 mg/kg) and xylazine (100 mg/kg) and the brain tissue was collected and kept in buffered formalin solution (10% formaldehyde, 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 45 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Pathological analysis was performed in tissue samples stained with hematoxylin and eosin (H&E) (Harris Hematoxylin: NewProv, Cod. PA203, Paraná, BR; Eosin: BIOTEC Analytical Reagents, Cod. 4371, Paraná, BR).

The anti-OROV clones 63B3E7 and 268B8A3, at 1:100 dilution were used in immunohistochemistry assays (IHC) of mice infected brain tissues. The immunohistochemistry assay recommended an overnight incubation protocol for

the primary antibodies in a humid chamber, with a temperature between 2 and 8° C. The secondary polymer (Mouse/Rabbit PolyDetector DAB HRP Brown, BSB0205, BioSB, Santa Barbara, CA) was applied to the material tested for 40 minutes at room temperature. The technique was revealed with the addition of the complex 2, 3, Diaminobenzidine plus hydrogen peroxide substrate, for sufficient time for the development of the brown color, followed by counterstaining with Harris Hematoxylin. Two non-correlated mAbs that recognize flavivirus-specific 4G2 (hybridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112) and alphavirus-specific 1G1 (produced from the CHIKV E1 envelope protein) were used as negative controls. The experimental protocol using animals were approved by the Ethical Committee on Animal Research of the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz CEUA n° LW-20/20).

#### Mabs reactivity in different cell types

The reactivity of anti-OROV clone 63B3E7 mAb was evaluated by IFA in several cell lines infected by OROV (C6/36, Vero E6, A549, Huh-7.5 and THP-1-derived Macrophages). Briefly,  $1 \times 10^4$  cells/well seeded in 96-well plates were infected at MOI of 0.02, 0.1, 0.5, 2.5 and 12.5 with OROV and incubated at different time points (24h, 48h or 72h). At each time point, cells were fixed with 200  $\mu$ L/well of methanol-acetone (1:1) at -20°C for 1 hour. Next, 100  $\mu$ l/well of anti-OROV mAb 63B3E7, diluted 1:800 in 1% PBS-BSA was incubated for 1 hour at 37°C. After three washes with PBS-T, anti-mouse IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich) and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) were diluted 1:1,000 and 0.3 mM, respectively, in 1% PBS-BSA and incubated for 1 hour at 37 °C. After three washes with 100  $\mu$ l/well of PBS plates were analyzed under fluorescent microscopy. The images were captured by the Operetta CLS High-Content Analysis System (PerkinElmer, Massachusetts, USA) using a 20x non-confocal objective and analyzed using the Harmony Software (PerkinElmer). Nuclei quantification and percentage of cells infected by OROV infection were evaluated by staining with DAPI and Alexa Fluor 488, respectively.

For THP-1 cells, flow cytometry was used to evaluate the reactivity of anti-OROV clone 63B3E7 mAb.  $2 \times 10^5$  cells/well in 24-well plates were infected under the same conditions described above. After each incubation time, cells were harvest and treated with 200  $\mu$ l/well of blocking buffer (PBS + 5% FBS + 1% AB+

human sera) for 20 minutes at room temperature, fixed with Citofix/Citoperm (BD Biosciences, USA) and incubated with the anti-OROV mAb 63B3E7 diluted 1:400 in Perm/Wash (BD Biosciences) for 30 minutes at 37 °C. After three washes with Perm/Wash solution cells were incubated with Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse IgG antibody (Invitrogen) diluted 1:400 in Perm/Wash. After 30 minutes of incubation, cells were washed again and recovered in 200 µL/well of filtered PBS and the quantification of infected cells was performed in the BD FACS Canto II equipment (BD Biosciences, USA) and analyzed in the FlowJo software (BD Biosciences, USA).

### 3. Results

Fusion of murine splenocytes with P3x63Ag8.653 cells resulted in 1,272 hybridomas. Of these, 968 wells were screened and 148 (15%) were positive by IFA analysis of C6/36 cells infected by OROV (MOI of 1 for 48h). In the second round of screening, 34.5% of the 148 initial clones (51) continued to produce anti-OROV antibodies and did not react with the MOCK control (Figure 1B). The cells presenting the highest density and immunofluorescence intensity in the plate wells were subjected to limiting dilutions (LD) to obtain a single cell per well. After two successive limiting dilution cycles, two hybridomas secreting anti-OROV mAbs were obtained (Figure 1 B-C). The hybridoma were expanded in culture and the supernatant from both clones were purified and concentrated by precipitation with ammonium sulfate. The mAb was identified as IgG2a (clone 63B3E7) and IgM (clone 268B8A3) isotypes with kappa light chains.

The specificity of the two anti-OROV antibodies were evaluated by IFA using uninfected (MOCK) and infected (OROV) C6/36 cells (Figure 1 D-F). Both mAbs 63B3E7 and 268B8A3 specifically reacted with OROV infected cells (Figure 1 C-F) and no unspecific reaction was observed in MOCK infected cells. The staining pattern of C6/36 infected cells was similar with anti-OROV clone 63B3E7 and the polyclonal sera (1:800) (Figure 1 D-E).

Infected and MOCK cell lysates and purified OROV supernatant were used in western blot assays to verify the identity of viral proteins recognized by both mAbs. The mAb 63B3E7 target only one viral protein with approximately 25 kDa

(Figure 2 A and B) in OROV positive samples. The mAb 268B8A3 did not react with any protein in the samples (Figure 2 A).

In addition, we evaluated the applicability of the two mAbs in IHC assays. The mAbs 63B3E7 and 268B8A3 reacted and differentiated the OROV infection (Figure 3 A and C) from MOCK (Figure 3 B and D) in mouse neuronal tissue. In both mAbs, the deposit of a granular brown stain (DAB) indicative of immunoreaction positivity is seen in the cytoplasm of cortical neurons, especially in the perinuclear region. The pyramidal cortical neurons and those located in the hippocampus presented the highest and strongest positivity. No immunopositivity was observed in glial cells, endothelial cells, or any other cell types present in the mouse central nervous system. Despite the mAbs were able to differentiate between infected and uninfected tissue, mAb 268B8A3 clearly produce a higher background in uninfected neuronal tissue at the dilution tested (Figure 3D), compared to mAb 63B3E7. Non-correlated mAbs (4G2 and 1G1) did not react to OROV proteins (Figure 3 E-F).

To analyse the reactivity of anti-OROV 63B3E7 mAb in different cells lines, C6/36, Vero E6, Huh-7.5, A172, A549 and THP-1-derived macrophages, were infected each strain with OROV. The 63E3E7 mAb specifically detected OROV antigen in cell culture, and did not cross react with cells proteins in all tested lineages (Figure 4). We determined that mAb 63B3E7 detect OROV-infected cells in IFA at low MOIs, as demonstrated in Huh-7.5 cell infected with MOI 0.00125 after 24 h (Supplementary Figure 1).

#### **4. Discussion**

OROV causes frequent outbreaks in the states of Pará<sup>6</sup> and Amazonas<sup>6,30</sup>, and more recently, cases of infection have been reported in other regions of Brazil, such as the Southeast<sup>14,31</sup> and Central<sup>20</sup> regions, confirming viral spread<sup>21,32</sup>. Because the clinical signs of OROV infection are undifferentiated from other arboviral infections as dengue, especially in the early phase, the number of ORO fever cases is underreported. As a neglected virus, only few studies address the prevalence and dispersion of OROV and, its impact in the epidemiological panorama in Brazil and South America. In this context, the development of reagents, as specific monoclonal antibodies would be relevant not only for

diagnostic purposes but also for research on viral biology, pathogenesis and epidemiology, especially in countries in which dengue and OROV are endemic and sympatric<sup>20</sup>.

Currently the diagnosis for OROV detection is essentially based on molecular tests, such as RT-PCR or real time RT-PCR<sup>14,20,33</sup> as well as classical virology tests (viral isolation, hemagglutination inhibition, PRNT and complement fixation tests)<sup>4,8,19</sup>. However, these are laborious, highly complex techniques and require specialized professionals to interpret the data. A simpler alternative would be the use of antibody-based tests. The antibodies used in the only commercially available test are polyclonal sera<sup>34,35</sup> or ascite fluids (ATCC; VR-1228AF) from animals infected with OROV<sup>36</sup>. These reagents present variations from lot to lot that might impact in the results. Therefore, the development of defined and stable reagents, such as anti-OROV monoclonal antibodies, would guarantee the specificity and reproducibility of the assays, improving the diagnosis of the disease, and in addition to being useful for research purposes<sup>21,25</sup>.

We produced and characterized two mAbs able to differentiate OROV-infected cells or tissues from uninfected controls. Although both Mabs were able to detect OROV infection, the mAb 63B3E7 yielded better results both in IFA and IHC formats. In IFAs, mAb 63B3E7 specifically target viral proteins in all infected cell lines (lineages derived from humans, non-human primates and mosquitoes) used in this study, yielding results comparable to the literature data.<sup>37,38</sup>

The two mAbs are from different isotypes (1 IgG2a and 1 IgM) and are probably targeting different epitopes as both were reactive in IFI and IHC assays but not in western blots<sup>39</sup>. The western blot results suggest that mAb 63B3E7 recognizes a linear epitope of a protein with approximately 25 kDa in OROV samples. During viral replication cycle, three main proteins are synthesized: the nucleocapsid protein with ~26.26 KDa, the non-structural protein M with 26.65 KDa and the Gn viral envelope glycoprotein with 28.03 kDa<sup>8,40,41</sup>. Using purified virus particles in western assays the mAb 63B3E7 strongly reacted with a protein with a molecular weight in the range of 25KDa suggesting that the OROV nucleocapsid protein might be the target of mAb 63B3E7. These results agree with the results obtained for mAbs of La Crosse and Tahyna viruses, which are viral species of the same family of OROV. In a study using La Crosse virus, the G2 protein ontologically corresponds to the Gn protein of OROV. This protein is

less immunogenic when compared to other structural proteins, such as N protein and G1 (higher molecular weight envelope glycoprotein). These latter proteins are the main targets of produced monoclonals <sup>42</sup>. In denaturing western blot assays, the mAb 268B8A3 did not react with the proteins present in the sample, possibly because it targets a conformational epitope <sup>39</sup>, since it recognized OROV proteins in IFA and IHC assays.

A percentage of OROV-infected patients can progress to a more serious clinical outcome involving neurological manifestations such as viral meningitis <sup>14,16</sup>, however the exact mechanism(s) is not known. There are three studies <sup>35,43,44</sup> that have developed murine models to study OROV neuroinfection. These studies, together, show the neural route and crossing the blood-brain-barrier <sup>43</sup>, glial activation and neuronal cell death <sup>35</sup>. Aiming to determine if the mAbs we developed would be useful for the study of viral biology and diagnosis using IHC, we infected IC mice with OROV and examined neuronal tissues. However, immunostaining was not observed in any cell type, except in cortical neurons. The immunopositivity of both mAbs was easy to obtain with standard protocol for the immunohistochemistry technique. The brown staining that appears after DAB is easily observed, very strong, and specifically perinuclear intracytoplasmic, making the immunolocalization for the OROV-positive area by light microscopy reliable. The mAb 268B8A3 showed a slight background in the glial matrix.

Summing up, we produce and characterized two mAb which specifically recognize OROV proteins. This reagent proved to be versatile, and especially useful for differential diagnosis of OROV from other arboviruses of medical importance, like dengue virus and yellow fever virus that co-circulate in Brazil and South America. As the anti-OROV mAbs are of different isotype (IgG2a and IgM), and possibly target different epitopes, they could be employed in serological assays, as capture ELISA or point-of-care tests for laboratory diagnosis of OROV using both mAbs.

To improve the use of this reagent, we intend to analyze the sensitivity and specificity of the Mabs conjugated with molecules (colloidal gold and fluorophores), in diagnostic assays, as seen in tests for dengue virus for example <sup>45,46</sup>. For OROV, there are no commercially available mAb-based diagnostic tests, mainly due to the lack of commercial interest as OROV fever is considered a neglected disease. Moreover, there are a paucity in the knowledge about basic

aspects of the viral biology and pathogenesis, also due the absence of specific reagents. Consequently, the search and development of such reagents are extremely valuable to fill these gaps since the outbreaks caused by OROV is generally confused with the dengue virus infections. We evaluate that the mAbs developed may be useful supporting research, diagnosis and epidemiological surveillance of OROV infections.

## 5. References

1. Pinheiro, F. P., Travassos Da Rosa, A. P. A., Gomes, M. L. C., LeDuc, J. W. & Hoch, A. L. Transmission of oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. *Science* (80-. ). **215**, 1251–1253 (1982).
2. Pinheiro, F. F. ., Pinheiro, M. ., Bensabath, G. ., Causey, O. R. . & Shope, R. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Rev. do Serviço Espec. Saúde Pública* **12**, 15–23 (1962).
3. Travassos da Rosa, J. F. *et al.* Oropouche Virus: Clinical , Epidemiological , and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **96**, 1019–1030 (2017).
4. Travassos da Rosa, A. *et al.* Arbovirus research in the Brazilian Amazon. *Arbovirus Res. Aust. - Proc. 5th Symp.* 4–8 (1989).
5. Vasconcelos, H. B. *et al.* Oropouche fever epidemic in Northern Brazil : Epidemiology and molecular characterization of isolates. *J. Clin. Virol.* **44**, 129–133 (2009).
6. Azevedo, R. D. S. D. S. *et al.* Reemergence of Oropouche fever, Northern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 912–915 (2007).
7. ICTV. ICTV 2015 Master Species List ( MSL30 ). (2017).
8. Travassos Da Rosa, J. F. *et al.* Oropouche virus: Clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected orthobunyavirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **96**, 1019–1030 (2017).
9. Obijeski, J. F., Bishop, D. H. L., Murphy, F. A. & Palmer, E. L. Structural Proteins of La Crosse Virus. *J. Virol.* **19**, 985–997 (1976).
10. Elliott, R. M. Nucleotide sequence analysis of the Small (S) RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* **70**, 1281–1285 (1989).
11. Elliott, R. M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 673–685 (2014).
12. Elliott, R. M. Identification of nonstructural proteins encoded by viruses of the Bunyamwera serogroup (family Bunyaviridae). *Virology* **143**, 119–126 (1985).
13. Acrani, G. O. *et al.* Establishment of a minigenome system for oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously. *J. Gen. Virol.* **96**, 513–523 (2015).
14. Vernal, S., Martini, C. C. R. & Fonseca, B. A. L. da. Oropouche Virus–Associated Aseptic Meningoencephalitis, Southeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 380–382 (2019).
15. Almeida, G. M. *et al.* Neural Infection by Oropouche Virus in Adult Human Brain Slices Induces an Inflammatory and Toxic Response. *Front. Neurosci.* **15**, 1–12 (2021).
16. Bastos, M. D. S. *et al.* Short report: Identification of oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 732–735 (2012).
17. Pinheiro, F. P. *et al.* Meningitis associated with Oropouche virus infections. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **24**, 246–251 (1982).
18. Files, M. A. *et al.* Baseline mapping of Oropouche virology, epidemiology, therapeutics, and vaccine research and development. *npj Vaccines* **7**, (2022).

19. Mourão, M. P. G. *et al.* Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 2063–2064 (2009).
20. da Costa, V. G., de Rezende Féres, V. C., Saivish, M. V., de Lima Gimaque, J. B. & Moreli, M. L. Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* **62**, 84–85 (2017).
21. Brasil, M. da S. Monitoramento de casos de febre do Mayaro e febre do Oropouche até a Semana Epidemiológica 35, 2019. *Bol. Epidemiológico* **50**, 1–35 (2019).
22. Zanluca, C., Mazzarotto, G. A. C. A., Bordignon, J. & Dos Santos, C. N. D. Development, characterization and application of monoclonal antibodies against Brazilian dengue virus isolates. *PLoS One* **9**, (2014).
23. Mazzarotto, G. A. C. A. *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus. *J. Virol. Methods* **162**, 96–100 (2009).
24. Andreolla, A. P., Erpen, L. M. S., Frandoloso, R. & Kreutz, L. C. Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus. *Brazilian J. Microbiol.* **49**, 68–75 (2018).
25. Nelson, P. N. *et al.* Demystified...Monoclonal antibodies. *J Clin Pathol Mol Pathol* **53**, 111–117 (2000).
26. Piedimonte, G. *et al.* A Humanized Monoclonal Antibody against Respiratory Syncytial Virus (Palivizumab) Inhibits RSV-Induced Neurogenic-Mediated Inflammation in Rat Airways. *Pediatr. Res.* **47**, 351–356 (2000).
27. Cardoso, B. F. *et al.* Detection of oropouche virus segment s in patients and in culex quinquefasciatus in the state of mato grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 745–754 (2015).
28. Calisher, C. H., Shope, R. E. & Walton, T. E. Cell cultures for diagnosis of arbovirus infections in livestock and wildlife. *J. Tissue Cult. Methods* **11**, 157–163 (1988).
29. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
30. Nunes, M. R. T. *et al.* Oropouche orthobunyavirus: Genetic characterization of full-length genomes and development of molecular methods to discriminate natural reassortments. *Infect. Genet. Evol.* **68**, 16–22 (2019).
31. Teixeira Nunes, M. R. *et al.* Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1610–1613 (2005).
32. Brasil, M. da S. Boletim de vigilância laboratorial dos arbovírus. *Boletins Epidemiológico* **52**, 7–18 (2021).
33. Rojas, A. *et al.* Real-time RT-PCR for the Detection and Quantitation of Oropouche virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* **96**, 1–13 (2020).
34. de Souza Luna, L. K. *et al.* Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. *J. Med. Virol.* **89**, 1108–1111 (2017).
35. Santos, R. I. *et al.* Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with oropouche virus. *Virus Res.* **170**, 25–33 (2012).
36. Proenca-Modena, J. L. *et al.* Oropouche Virus Infection and Pathogenesis Are Restricted by MAVS, IRF-3, IRF-7, and Type I Interferon Signaling Pathways in Nonmyeloid Cells. *J. Virol.* **89**, 4720–4737 (2015).
37. Santos, R. I. M. *et al.* Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Res.* **138**, 139–143 (2008).
38. Acrani, G. O. *et al.* Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Res.* **149**, 56–63 (2010).
39. Forsström, B. *et al.* Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One* **10**, 1–11 (2015).
40. Calisher, C. H. & Karabatsos, N. Arbovirus serogroups: definition and distribution. in *The arboviruses: epidemiology and ecology* (ed. Monath, T. P.) 19–57 (CRC Press, 1988).
41. Tilston-Lunel, N. L., Acrani, G. O., Randall, R. E. & Elliott, R. M. Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs. *J. Virol.* **90**, 2616–2627 (2016).
42. Gonzalez-Scarano, F., Shope, R. E., Calisher, C. E. & Nathanson, N. Characterization of monoclonal antibodies against the G1 and N proteins of LaCrosse and Tahyna, two California serogroup bunyaviruses. *Virology* **120**, 42–53 (1982).
43. Santos, R. I. *et al.* Spread of oropouche virus into the central nervous system in mouse. *Viruses* **6**, 3827–3836 (2014).

44. Rodrigues, A. H. *et al.* Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Virus Res.* **155**, 35–41 (2011).
45. Limonta, D., Capó, V., Torres, G., Pérez, A. B. & Guzmán, M. G. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J. Clin. Virol.* **40**, 50–54 (2007).
46. Chong, C., Bee-lan, N., Tan, H. & Yap, E. Clinical and Diagnostic Virology A shortened dengue IgM capture ELISA using simultaneous incubation of antigen and peroxidase-. **1**, 335–341 (1994).

## FIGURES

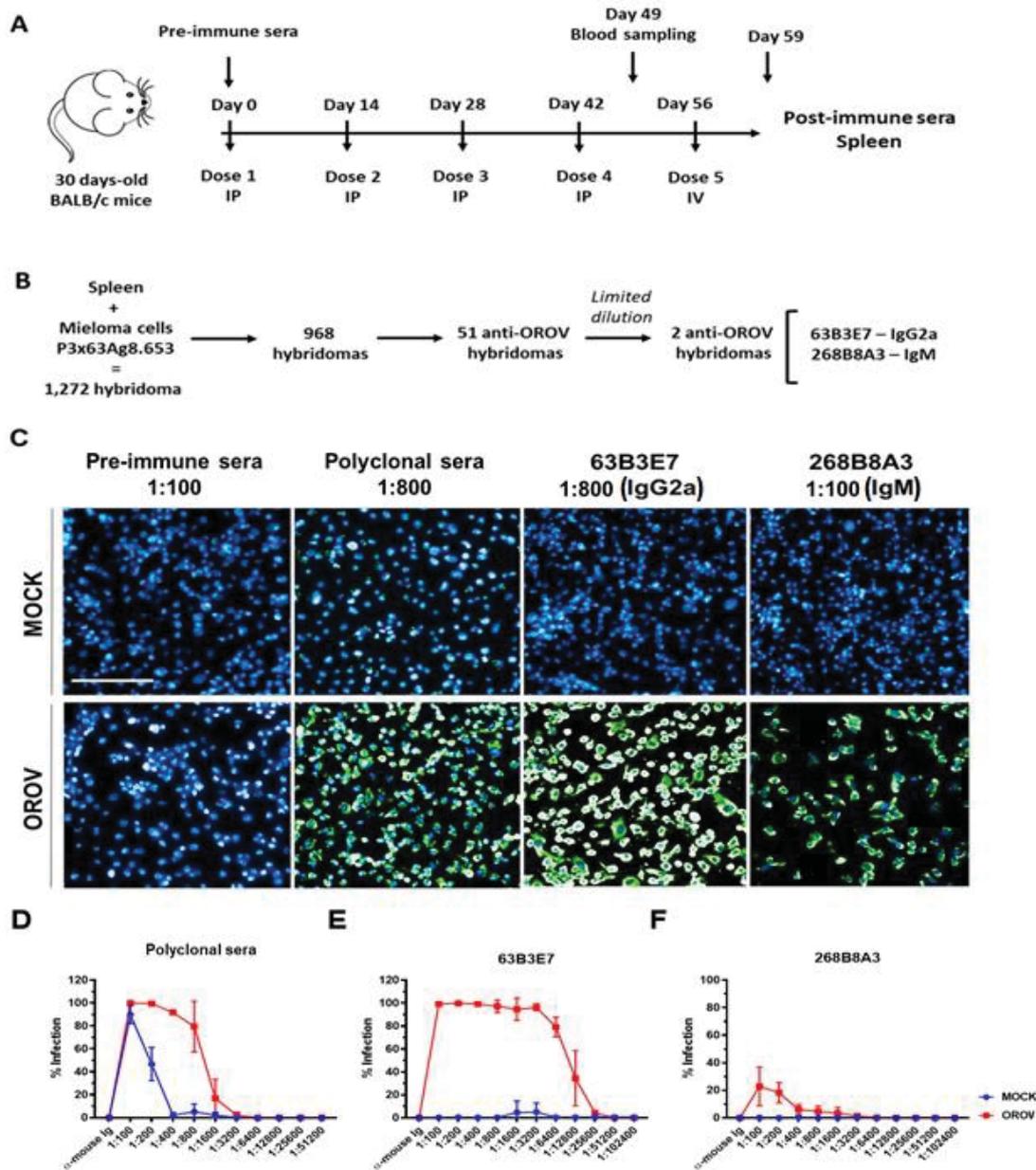


Figure 1: Production and selection of anti-OROv monoclonal antibodies. In A, scheme of inoculations in mice for the production of mAbs, together with the collection of sera. In B, the screening of hybridomas resulting from the fusion is demonstrated, in addition to the following steps for selecting the most promising ones. In C, representative IFA for detection of anti-OROv antibodies from clones 63B3E7 (1:800) and 268B8E3 (1:100), together with the control sera (pre-immune and polyclonal, diluted 1:100 and 1:800, respectively). The culture supernatant of the LD2 clones were purified and

evaluated for the detection of viral antigens in C6/36 cells ( $1 \times 10^4$  cells per well) uninfected (Mock) and infected with OROV (MOI 1 for 48h). In blue, cell nuclei stained with DAPI and in green OROV labeled with the respective mAb or polyclonal immune sera, followed by anti-mouse IgG conjugated with Alexa-Fluor 488. In D-F, infected (OROV - red) and uninfected (MOCK - C6/36) cells blue) were used for titration of polyclonal mouse sera (D), mAb 63B3E7 (E) and mAb 268B8A3 (F). Infection data obtained by IFA were normalized, analyzed, and plotted using Alexa-Fluor 488-conjugated anti-mouse Ig labeling. The bar corresponding a 100 $\mu$ m. D-F represents 3 experiments of three different biological replicas.

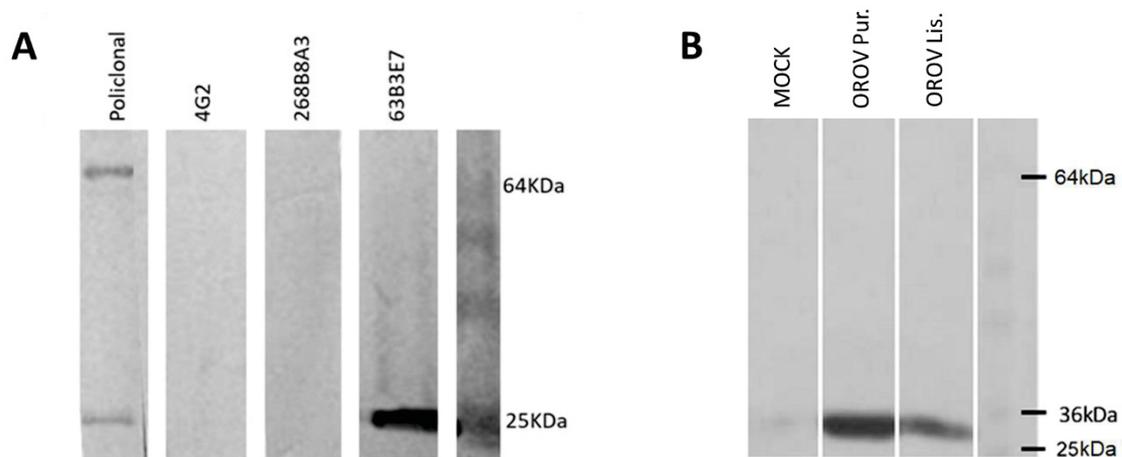


Figure 2: Western blots for the identification of OROV protein target by the mAbs 63B3E7 and 268B8A3. In A, OROV-infected Vero E6 cell extract reacted with anti-OROV mAbs 63B3E7 and 268B8A3. As controls an anti-OROV polyclonal immune sera and an anti-envelope of flavivirus mAb 4G2. In B, purified OROV (OROV Pur. line), OROV infected Vero E6 cell lysate (OROV Lys. line) or uninfected Vero E6 lysate (MOCK line) reacted with mAb 63B3E7. Both are subjected to 13% SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Proteins were stained with the mAbs, followed by anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase. Molecular weight marker 10-250 kD.

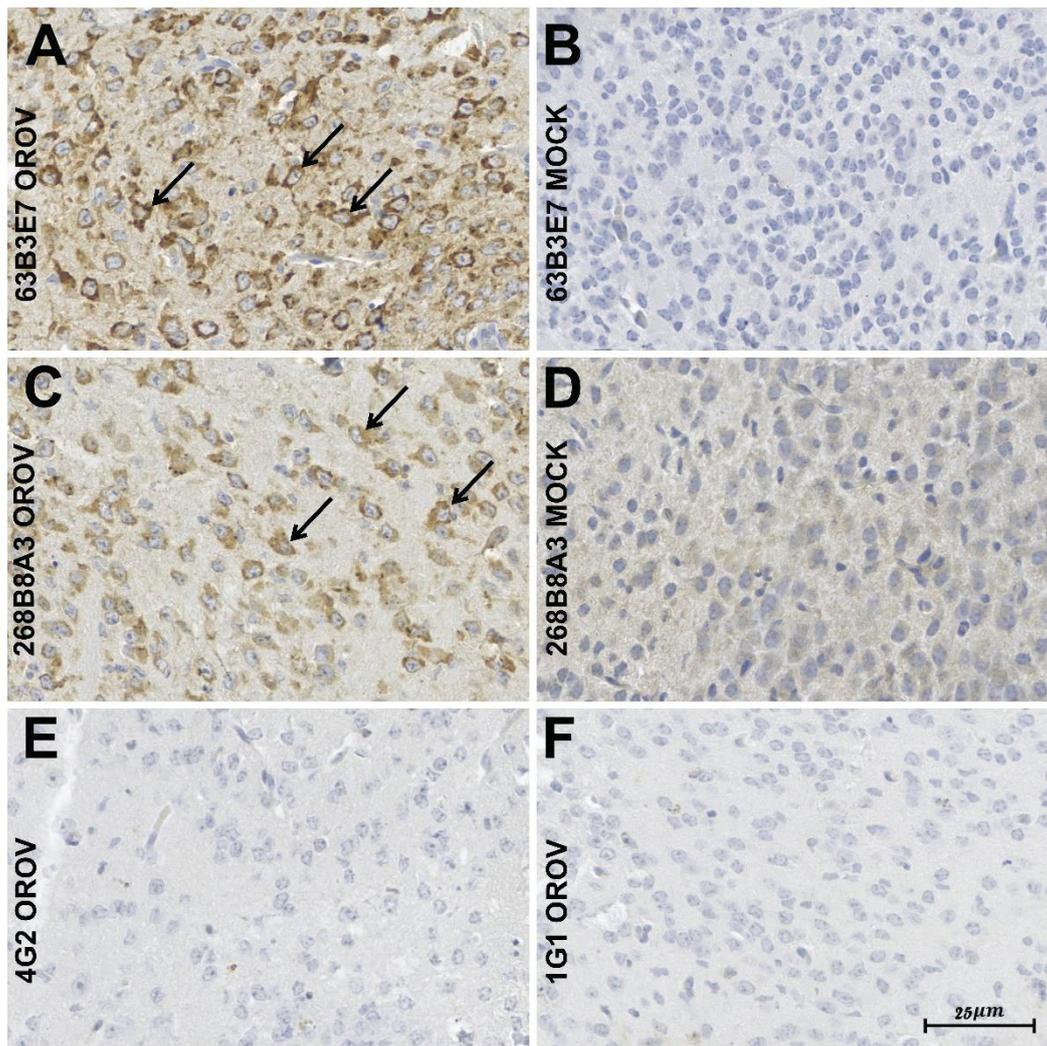


Figure 3: Immunohistochemistry in mouse neuronal tissue infected by OROV. Red arrows demonstrate perinuclear staining in neuronal tissue of mice infected by OROV and stained with mAb 63B3E7 (A) and mAb 268B8A3 (C). Image depicting the absence of perinuclear tissue and neuronal cytoplasmic immunolabel of the mAb 63B3E7 (B) and mAb 268B8A3 (D) in a neuronal tissue of mice uninfected with OROV (MOCK). In E and F is demonstrated negative control with non-correlation mAbs, 4G2 and 1G1, respectively. The bar corresponding 25  $\mu\text{m}$ .

### 63B3E7

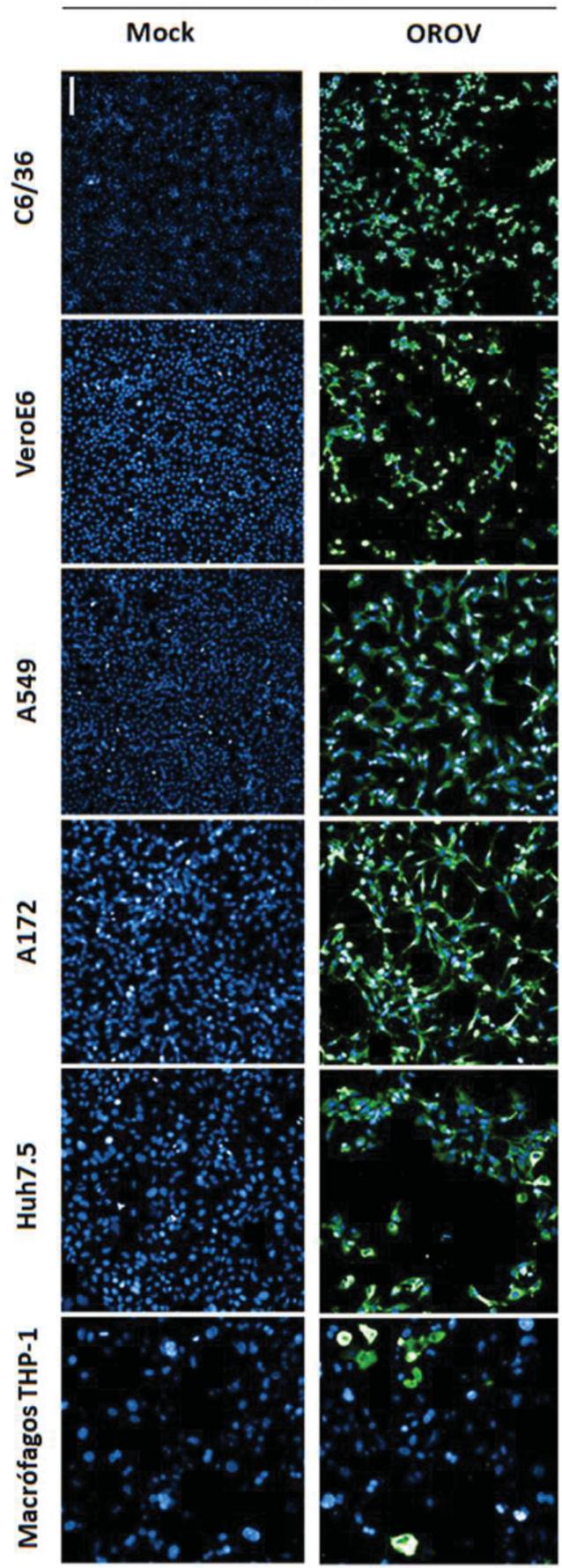
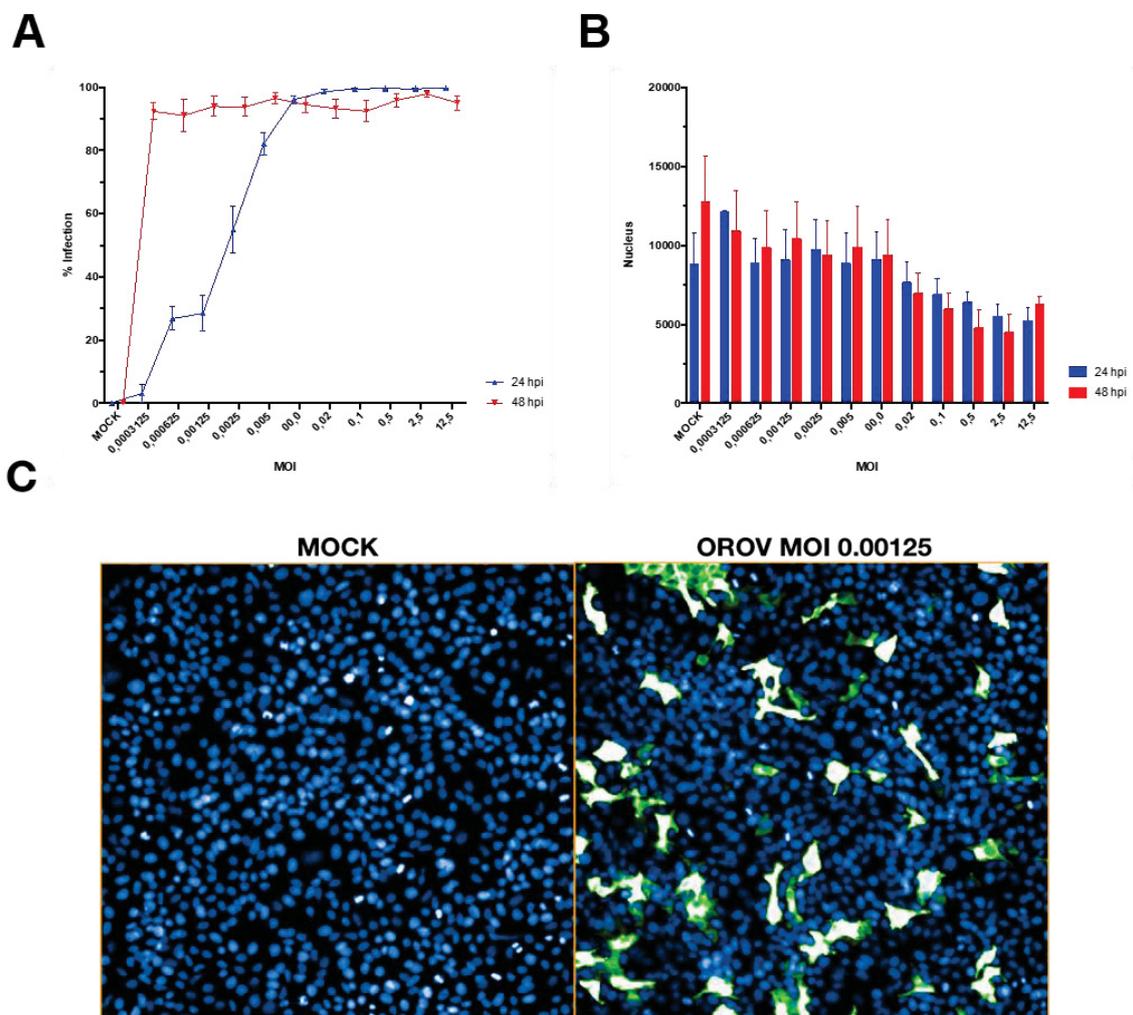


Figure 4: Reactivity in different cell types. A representative image of the permissiveness to OROV of cultures of C6/36, Vero E6, A172, A549, Huh-7.5 and macrophages differentiated from THP-1 is shown. In blue, nuclei stained with DAPI and, in green, OROV labeled with mAb 63B3E7, followed by anti-mouse IgG conjugated with Alexa-Fluor 488. In the images, MOCK represents uninfected cells after 72h, and OROV cells infected with OROV MOI 0.02 for 72 h. The bar corresponding 100  $\mu\text{m}$ . The images represent 3 biological replicas.



Supplementary 1: Infection of Huh-7.5 cells with OROV. The normalized percentage of OROV infection in Huh-7.5 cells (A) and the nuclear quantification (B) are demonstrated in different MOIs ( $12.5 - 3.125 \times 10^{-4}$ ) after 24 h (line and bars in blue, respectively) and 48 h (line and bars in red, respectively), by IFI. The image representative of one of the smallest MOIs

tested (MOI 0.00125, 24 hpi) is demonstrated in C. In blue, DAPI stained nuclei and, in green, OROV labeled with mAb 63B3E7, followed by anti-mouse IgG conjugated to Alexa -Fluor 488. MOCK: uninfected cells after 24 h. A-B represents 3 experiments of three different biological replicas.

## 12. ANEXO III – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções  
Biológicas - VPPCB



Comissão de Ética  
no Uso de Animais

---

LICENÇA

LW-20/20

Certificamos que o protocolo (P-46/19.4), intitulado "**Caracterização de modelos murinos de viroses emergentes para isolamento viral, avaliação imunológica e triagem de compostos para terapia: citotoxicidade e atividade antiviral.**", sob a responsabilidade de **CLAUDIA NUNES DUARTE DOS SANTOS**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

**Esta licença tem validade até 03/08/2024 e inclui o uso total de:**

***Mus musculus***

- 355 Machos de BALB/c, Idade: 6 Semana(s), Peso: 13,0000 Grama(s).
- 370 Fêmeas de BALB/c, Idade: 6 Semana(s), Peso: 13,0000 Grama(s).
- 50 fetos, Idade: 14 dias.
- 150 neonatos, Idade: 2 dias.

***Mus musculus***

- 420 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 13,0000 Grama(s).
- 420 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 13,0000 Grama(s).
- 100 neonatos, Idade: 2 dias.

***Mus musculus***

- 820 Machos de A129 KO, Idade: 6 Semana(s), Peso: 13,0000 Grama(s).

- 900 Fêmeas de A129 KO, Idade: 6 Semana(s), Peso: 13,0000 Grama(s).
- 200 fetos, Idade: 14 dias.
- 200 neonatos, Idade: 2 dias.

***Mus musculus***

- 220 Fêmeas de DBA/1, Idade: 6 Semana(s), Peso: 13,0000 Grama(s).

***Mus musculus***

- 220 Fêmeas de NOD, Idade: 6 Semana(s), Peso: 13,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 03 de agosto de 2020.



**Octavio Augusto França Presgrave**  
**Coordenador da CEUA/Fiocruz**