



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Clarita Maria Secco Avilla

**Acridonas com potencial atividade antiviral na replicação do vírus
Oropouche**

São José do Rio Preto

2021

Clarita Maria Secco Avilla

**Acridonas com potencial atividade antiviral na replicação do vírus
Oropouche**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora : FAPESP – Proc. 2017/13341-1
CAPES

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Carolina Colombelli Pacca Mazaró

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Gomes Jardim

São José do Rio Preto

2021

A958a

Avilla, Clarita Maria Secco

Acridonas com potencial atividade antiviral na replicação do vírus
Oropouche / Clarita Maria Secco Avilla. -- São José do Rio Preto, 2021
70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientadora: Carolina Colombelli Pacca Mazaro

Coorientadora: Ana Carolina Gomes Jardim

1. Arboviroses. 2. Acridonas. 3. Medicamentos antivirais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Clarita Maria Secco Avilla

**Acridonas com potencial atividade antiviral na replicação do vírus
Oropouche**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora : FAPESP – Proc. 2017/13341-1
CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Carolina Colambelli Pacca Mazaro
Faceres – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Bernardes Terzian
Instituto René Rachou-Fiocruz – Belo Horizonte/MG

Dr^a. Mariana Sequetin Cunha
Instituto Adolfo Lutz - São Paulo/SP

São José do Rio Preto

08 de julho de 2021

Dedicatória

A Deus, pelo dom da vida, ao meu marido
Jovair e aos nossos filhos Enrico e Romeo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Carolina Colambelli Pacca Mazaro, pela oportunidade de cursar Mestrado e pelo apoio e orientações durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Carolina Gomes Jardim pelo apoio na realização da pesquisa.

À FAMERP, na pessoa do Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pela cessão do Laboratório de Pesquisa em Virologia (LPV) para desenvolvimento deste trabalho, e a toda equipe do LPV pela amizade e colaboração, de forma especial a Nathalia Zini que me ensinou os primeiros passos no cultivo celular e sempre esteve à disposição para me ajudar.

Ao Prof. Dr. Luis Octávio Regasini e ao Laboratório de Química Verde e Medicinal (LQVM)- UNESP, pela cessão dos derivados de acridona utilizados neste estudo.

Ao Laboratório de Estudos Genômicos (LEGO) - UNESP, na pessoa da coordenadora Prof^a. Dr^a. Paula Rahal, pela cessão dos equipamentos para leitura das imunofluorescências.

À minhas amigas e colegas de profissão Andréa Jorge, Claudia Renata Machado e Priscila Lisboa Fábrica, pela inspiração e incentivo para cursar ensino superior.

Ao meu marido Jovair, pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

A Deus por todas as oportunidades que me concede.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2017/13341-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

O vírus Oropouche (OROV) é um arbovírus pertencente à família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, foi isolado pela primeira vez em Trinidad Tobago em 1955. Em 1960 foi identificado pela primeira vez no Brasil, no estado do Pará e um ano depois foi registrada a primeira epidemia no mesmo estado. Depois disso, outras epidemias ocorreram, principalmente na região norte do Brasil. Todavia, relatos de casos e inquéritos sorológicos tem demonstrado que o vírus está se espalhado pelo Brasil e América Latina e é visto como candidato a uma próxima epidemia nas Américas. Os sintomas são semelhantes aos de outras arboviroses além de possíveis acometimentos no SNC. Atualmente, não existem vacinas ou antivirais contra o OROV. Desta forma, é de suma importância a busca por moléculas ativas no controle da infecção viral. Os derivados de acridonas já demonstraram atividade biológica no tratamento de doenças como câncer, Alzheimer, e em doenças infecciosas bacteriana, viral e por protozoários. Portanto, o objetivo deste estudo é analisar a ação de um painel de derivados de acridonas na inibição da replicação do OROV. Para tanto, um painel de onze acridonas (FAC2-FAC7, FAC15-FAC17 e FAC20-FAC22), foram testadas e quatro selecionadas (FAC16, FAC20, FAC21 e FAC22) para continuidade dos estudos. Inicialmente, realizou-se ensaio de viabilidade celular (MTT) (300-2,34 μ M), em linhagens celulares VERO, para definir a concentração viável dos compostos. Os resultados obtidos mostraram inibição total da replicação viral em células tratadas com as moléculas FAC20 e FAC22, não havendo formação de placas. Em relação a FAC21, a redução foi de 90%, enquanto a FAC16 reduziu aproximadamente 75% a formação de placas. Na avaliação da inibição da replicação viral pelo ensaio virucida a FAC20 inibiu completamente a formação de placas, já as FAC16 e FAC21 inibiram aproximadamente 85% e a FAC22 mostrou redução de 90% a replicação viral. Nos ensaios de imunofluorescência, os mesmos foram realizados com protocolo de tratamento, virucida e pré-tratamento, a inibição da replicação também foi observada nestes ensaios. Com o trabalho realizado, foi possível concluir que os derivados de acridona utilizados no presente estudo apresentam potencial na inibição da replicação do OROV in vitro.

Palavras-Chave: Arbovírus. Acridona. Orthobunyavirus. Terapêutica

ABSTRACT

The Oropouche virus (OROV) is an arbovirus that belongs to the Peribunyaviridae family, genus Orthobunyavirus, and was isolated for the first time in Trinidad Tobago in 1955. In 1960 it was identified for the first time in Brazil, in the state of Pará and a year later the first epidemic in the same state happened. After that, other epidemics occurred, mainly in the northern region of Brazil. However, case reports and serological surveys have shown that the virus is spreading in Brazil and Latin America and is seen as a candidate for an upcoming epidemics in the Americas. The symptoms are similar to those of other arboviruses in addition to possible CNS involvement. Currently, there are no vaccines or antivirals against OROV. Thus, the search for active molecules in the control of viral infection is extremely important. Acridone derivatives have already shown biological activity in the treatment of diseases such as cancer, Alzheimer's, and in infectious bacterial, viral and protozoan diseases. Therefore, the aim of this study was to analyze the action of an acridone derivative panel in inhibiting OROV replication. For this purpose, a panel of eleven acridones (FAC2-FAC7, FAC15-FAC17 and FAC20-FAC22), were tested and four selected (FAC16, FAC20, FAC21 and FAC22) to continue the studies. Initially, a cell viability test (MTT) (300-2.34 μ M) was carried out on VERO cell lines to define the viable concentration of the compounds. The results obtained showed total inhibition of viral replication in cells treated with the molecules FAC20 and FAC22, with no plaque formation. In relation to FAC21, the reduction was 90%, while FAC16 reduced approximately 75% of the formation of plaques. In assessing the inhibition of viral replication by the virucidal assay, FAC20 completely inhibited plaque formation, whereas FAC16 and FAC21 inhibited approximately 85% and FAC22 showed a 90% reduction in viral replication. In the immunofluorescence assays, which were performed with treatment protocol, virucide and pre-treatment, inhibition of replication was also observed in these assays. With the work done so far, it was possible to conclude that the acridone derivatives used in the present study have the potential to inhibit OROV in vitro replication.

Keywords: Arbovirus. Acridone. Orthobunyavirus. Therapeutics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fêmea de <i>Culicoides</i>	19
Figura 2: Organização estrutural esquemática do OROV.....	24
Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação de vírus família <i>Perybunyaviridae</i>	26
Figura 4: Coinfecção por vírus de genoma segmentado dando origem a rearranjos genéticos.....	27
Figura 5: Distribuição do OROV segundo genótipo.....	28
Figura 6: Ciclo biológico do OROV na interface selvagem e doméstica.....	30
Figura 7: Mapa de distribuição do OROV.....	35
Figura 8: Estrutura básica das acridonas.....	37
Figura 9: Estrutura química dos derivados de acridona FAC2-FAC7, FAC15-FAC17, FAC20-22.....	40
Figura 10: Gráfico da análise de citotoxicidade das acridonas.....	46,47,48,49
Figura 11: Avaliação da inibição da replicação viral em células tratadas segundo inibição do número de placa.....	49
Figura 12: Gráfico da avaliação da atividade virucida.....	50
Figura 13: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas e tratadas com FAC16.....	51
Figura 14: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC16.....	51

Figura 15: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas e tratadas com FAC20.....	52
Figura 16: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC20.....	52
Figura 17: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células previamente tratadas com FAC20 e depois infectada com OROV.....	53
Figura 18: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas e tratadas com FAC21.....	53
Figura 19: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC21.....	54
Figura 20: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células previamente tratadas com FAC21 e infectada com OROV.....	54
Figura 21: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas e tratadas com FAC22.....	55
Figura 22: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC22.....	55
Figura 23: Imagem gerada por imunofluorescência: (a) controle viral (b) controle celular (c) células previamente tratadas com FAC22 e infectada com OROV.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
CC50	Concentração Citotoxicidade 50%
cDNA	DNA complementar
CFT	Teste de fixação do complemento
CHIKV	Vírus Chikungunya
CMC	Carboximetilcelulose
CMV	Citomegalovírus
DENV	Vírus Dengue
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Proteína do envelope viral E
EIA-ICC	Teste imuno-enzimático em culturas celulares infectadas
Gc	Glicoproteína de superfície
Gn	Glicoproteína de superfície
HCV	Vírus da hepatite C
HI	Inibição de Hemaglutinação
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HSV-2	Vírus Herpes Simples tipo 2
IF	Imunofluorescência Indireta
IFN-α	Interferon alfa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMPHD	Inosina Monofosfato Desidrogenase

LCR	Líquido Cefalorraquidiano
L15	Meio Leibovitz
MAC Elisa	Teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina da classe M
MAYV	Vírus Mayaro
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
mL	Mililitro
MOI	Multiplicity of Infection
mRNAs	RNA mensageiro
MTT	Brometo de azul de tiazolil tetrazólio
N	Proteína nucleocapsídica
NSm	Proteína não estrutural m
NSs	Proteína não estrutural s
NS3	Helicase proteína viral
OROV	Vírus Oropouche
PBS	Solução salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidade formadora de placa
PRNT	Poder relativo de neutralização total
qPCR	PCR quantitativo
RdRp	RNA dependente de RNA polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
ROCV	Vírus Rocio
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SFB	Soro Fetal Bovino

SNC	Sistema nervoso Central
SLEV	Vírus da Encefalite de Saint Louis
YFV	Yellow fever virus – vírus da Febre Amarela
v/v	volume/volume
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Arbovírus.....	15
1.2. Vetor.....	17
1.3. Vírus Oropouche.....	20
1.4. Patogênese.....	21
1.5. Vírus - estrutura e estratégia de replicação.....	23
1.6. Ciclo Biológico.....	28
1.7. Diagnóstico.....	30
1.8. Epidemiologia.....	31
1.9. Tratamento.....	35
1.10. Atividade biológica das Acridonas.....	36
2. OBJETIVO.....	38
2.1. Objetivo geral.....	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. METODOLOGIA.....	39
3.1. Síntese de compostos.....	39
3.2. Lignagens celulares	41
3.3. Produção Viral.....	41
3.4. Titulação Viral	42
3.5. Avaliação da Citotoxicidade.....	42
3.6. Avaliação da inibição da replicação viral em células tratadas segundo inibição do número de placas.....	43
3.7. Avaliação da atividade virucida.....	43
3.8. Avaliação da atividade antiviral como pré-tratamento.....	44
3.9. Avaliação da atividade antiviral por imunofluorescência.....	44
3.10. Análise dos resultados.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Avaliação da Citotoxicidade.....	46

4.2. Avaliação da inibição da replicação viral em células tratadas segundo inibição do número de placas.....	49
4.3. Avaliação da atividade virucida.....	50
4.4. Avaliação da atividade antiviral por imunofluorescência.....	50
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arbovírus

Arbovírus (*Arthropod borne Viruses*) são assim designados devido parte de seu ciclo replicativo ocorrer em insetos, podendo ser transmitidos aos seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos. Dos mais de 545 espécies de arbovírus conhecidos, cerca de 150 causam doenças em humanos ou animais (Gubler 2001, Cleton, Koopmans *et al.* 2012).

O conceito de arbovírus teve início em 1881 quando o médico cubano Juan Carlos Finlay presumiu que a Febre Amarela era transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* e, até então, acreditava-se que a falta de higiene seria a causa da disseminação da doença. Alguns anos depois, Walter Reed e colaboradores comprovaram através de experimentos com voluntários humanos a teoria da transmissão através da picada do mosquito (Calisher 2005).

Causadores de doenças em animais e humanos em quase todo o mundo, infectando elevado número de indivíduos e provocando um grande prejuízo econômico e social, os arbovírus geralmente são mantidos na natureza por meio de um ciclo silvestre que envolve hospedeiros vertebrados suscetíveis e vetores artrópodes hematófagos, sendo os vetores de maior importância mosquitos (ex: *Aedes*), moscas (ex: *Phlebotominae*) e carrapatos (ex: *Ixodidae*). Primatas, marsupiais e aves são classificados como hospedeiros vertebrados de maior relevância para o ciclo de manutenção dos arbovírus (Gubler 1996).

O homem é hospedeiro acidental para a maioria das arbovirose e se infecta ao penetrar em áreas enzoóticas, com exceção apenas para o vírus do Dengue, em que é o hospedeiro (Fields 1998). Por outro lado, mudanças ecológicas no habitat natural destes vírus levam a alterações em seus ciclos, podendo haver adaptação a novos reservatórios e, com isto, aumentar sua multiplicação e o risco da emergência (Figueiredo 2007).

No homem, após a picada de um vetor infectado, o vírus é transmitido para a corrente sanguínea e circula livremente até atingir células alvos (cérebro, fígado, pele e vasos). Após a infecção, há um período de incubação durante o qual ocorre multiplicação viral, e sua intensidade e localização determinarão o aparecimento de manifestações clínicas, como febre acompanhada de mal-estar, cefaleia, náuseas, vômitos e mialgia (Figueiredo 2007, Travassos da Rosa, de Souza *et al.* 2017). De uma forma geral, infecções por arbovírus podem levar a quatro formas clínicas distintas, dentre as quais se destaca a doença febril (causada por praticamente todos os arbovírus patogênicos ao homem), doença febril com exantema, febre hemorrágica (no Brasil, causada apenas pelos vírus do Dengue e Febre Amarela) e encefalite (causada por diversos membros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Peribunyaviridae*). No entanto, sintomatologia inespecífica pode ser observada nas infecções por diferentes arbovírus, especialmente na fase aguda, dificultando o estabelecimento de um provável agente etiológico pelo médico assistente (Fonseca, Figueiredo 2002., Vasconcelos, Travassos da Rosa *et al.* 2005).

Sabe-se que os arbovírus estão presentes em todo o mundo, no entanto, as áreas tropicais apresentam o maior número de casos devido às condições climáticas favoráveis à manutenção do ciclo viral (Artsob, Lindsay *et al.* 2017). Além disso, diversas arboviroses que pareciam sob controle ressurgiram nos últimos anos, como exemplo disso temos a Febre Amarela, Dengue, Encefalite Japonesa e Encefalite Equina Venezuelana, ou ainda vírus que ampliaram sua distribuição geográfica, como a febre do Nilo Ocidental e do Vale do Rift (Weaver 2013, Marklewitz, Junglen 2019, Guth, Hanley *et al.* 2020).

O Brasil é um país tropical que apresenta condições ideais para a ocorrência de arboviroses por apresentar vasta extensão territorial (8.514.876 km²) e 60,7% do território coberto por vegetação (Meio Ambiente Brasileiro, 2010). No país já foram isoladas mais de 210 espécies diferentes de arbovírus, sendo que 36 delas causam doenças em humanos de forma esporádica, endêmica e/ou epidêmica. Em 2015, pelo menos nove arbovírus patogênicos que causam doenças em seres humanos circularam no Brasil (Figueiredo 2015). Tais vírus são responsáveis por aproximadamente 30% de todas as doenças infecciosas emergentes na última década (Jones, Patel *et al.* 2008), onde a maioria destes arbovírus são vírus de RNA

pertencentes às famílias *Flaviviridae*, *Peribunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*), *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) dentre outros. Dentre os principais representantes destas famílias, acometendo em média 95% dos casos notificados, encontram-se os *Alphavirus* Mayaro (MAYV) e Chikungunya (CHIKV), os *Flavivirus* Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV), Zika (ZIKV), Encefalite de Saint Louis (SLEV) e Rocio (ROCV) e o *Orthobunyavirus* Oropouche (OROV) (Figueiredo 2007, Figueiredo 2015, Mota, Terzian *et al.* 2016).

As arboviroses são uma ameaça significativa à saúde pública, devido às mudanças climáticas e ambientais e aos desmatamentos que favorecem a amplificação, a transmissão viral, além da transposição da barreira entre espécies. A prevenção e o controle de infecções por arbovírus requer vigilância para determinar a atividade do vírus combinada com vacinação, educação em saúde e estratégias de controle de vetores (Gubler 2001, Fragkoudis, Attarzadeh-Yazdi *et al.* 2009).

1.2. Vetor

Ensaio laboratoriais e estudos epidemiológicos mostraram que os mosquitos *Culex quiquefaciatus*, *Culex fatigans*, *Psorophora ferox*, *Coquilettidia venezuelensis*, *Aedes serratus*, *Aedes scapularis* e *Aedes albopictus* são suscetíveis à infecção por OROV o que os tornam suspeitos de participarem do ciclo de manutenção do vírus (Smith, Francly 1991), entretanto, o OROV tem como principal vetor o mosquito *Culicoides paraensis*, também conhecido no Brasil como maruim ou borrachudo (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1981, Pinheiro, Rocha *et al.* 1982).

O *Culicoides paraensis* é membro da família Ceratopogonidae, família esta que abrange aproximadamente 125 gêneros classificados em 5.500 espécies, configurando entre os insetos hematófagos mais abundantes e presentes em quase todo mundo exceto as regiões polares extremas, Nova Zelândia, Patagônia e Ilhas Havaianas. Já a espécie *paraensis*, esta distribuída desde o norte da Argentina até os EUA e é o mais frequente e disperso mosquito do hemisfério Ocidental, principalmente nos trópicos (Wirth, Felipe-Bauer 1989). Acredita-se que ampla distribuição geográfica dos *Culicoides* se deva a sua competência de reprodução e

sobrevivência em ambientes semiurbanos nas proximidades de locais com elevada densidade humana (Aybar, Juri *et al.* 2010, Carpenter, Groschup *et al.* 2013).

Os *Culicoides* são insetos holometábolos, cujo ciclo de vida inclui os estágios de ovo, larva, pupa e adulto, podendo durar de três semanas em climas tropicais até um ano em climas temperados (Mellor, Boorman *et al.* 2000). Podem ser encontrados em diversos tipos de ambientes; as larvas se desenvolvem em locais ricos em matéria orgânica em decomposição e elevada umidade como esterco de animais, lamaçais, poças, brejos, praias, pântanos, irrigações, buracos de árvores, frutas ou outros vegetais em decomposição, florestas e vegetação em geral (Diniz, Nunes *et al.* 2006). Possuem tamanho variável de 1 a 3 mm de comprimento, são crepusculares, tendo seu pico de atividade ao nascer e pôr do sol. Somente as fêmeas se alimentam de sangue para obtenção de proteína necessária para maturação dos ovos, realizam voos para procurar parceiros sexuais, refeições sanguíneas ou um sítio para deposição dos ovos. A extensão do voo é geralmente curta, com dispersão por centenas de metros ou até 2 a 3 km do seu sítio de criação (Humphreys, Turner 1973).

Além da transmissão de doenças, as picadas do *Culicoides* causam incômodo e conforme do grau de sensibilidade do indivíduo podem causar reações imediatas ou retardadas que variam de dermatites alérgicas, pápulas, pústulas até reações mais graves como eczema (M., R. *et al.* 2003).

Mosquitos *Culicoides* são vetores de protozoários, vírus e nematódeos para o homem, aves e mamíferos silvestres e domésticos (Mellor, Boorman *et al.* 2000). Pelo menos 50 arbovírus já foram isolados de mosquitos *Culicoides*, sendo o transmissor de doenças veterinárias importantes como, o vírus da peste equina, vírus da febre catarral ovina, vírus da doença hemorrágica epizoótica, vírus da encefalose equina, vírus Akabane e vírus Palyam (Mellor, Boorman *et al.* 2000). Todavia, o papel mais importante dos *Culicoides* na saúde pública, está na capacidade de transmissão biológica do OROV (Linley, Hoch *et al.* 1983).

Figura 1- Fêmeas de *Culicoides*.



Fonte: <https://planodesaude.net.br/blog/febre-oropouche/>

O OROV também pode ser encontrado em locais onde ocorre a presença de vetores secundários como os mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *Coquillettidia venezuelensis* e *Aedes serratus* (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1981, de Souza Luna, Rodrigues *et al.* 2017). O vírus já foi isolado de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* e *Aedes Serratus*, (Travassos da Rosa, de Souza *et al.* 2017), as duas espécies são tidas como vetores secundários e encontradas em abundância em ambiente silvestre (Cardoso, de Almeida *et al.* 2010).

Coquillettidia venezuelensis se reproduz em ambientes aquáticos como rios, lagos e piscinas e possui hábito de alimentação noturna (Alencar, Pacheco *et al.* 2011), já o *Aedes Serratus* tem hábito alimentar diurno atacando principalmente mamíferos de grande porte (Cardoso, de Almeida *et al.* 2010).

Culex quinquefasciatus é tido como um vetor de menor impacto na transmissão do OROV (Sakkas, Bozidis *et al.* 2018), é encontrado predominantemente em meio urbano e ataca animais e humanos, é intensamente distribuído em áreas tropicais e subtropicais (Guo, Li *et al.* 2016), condições climáticas sazonais como estações chuvosas e temperaturas baixas estão relacionadas com a distribuição e competência deste vetor. A reprodução pode ocorrer em recipientes artificiais ou águas poluídas e ricas em matéria orgânica. O

hábito alimentar é noturno e normalmente ataca humanos, aves, cães, cavalos, bois, anfíbios, porcos entre outros animais (Sakkas, Bozidis *et al.* 2018).

1.3. Vírus Oropouche

O Vírus Oropouche (OROV) é o agente etiológico da Febre do Oropouche, umas das infecções virais mais frequentes no Brasil (Bastos, Figueiredo *et al.* 2012).

Febre do Oropouche é uma doença arboviral emergente e tem chamado a atenção por estar associada às alterações do clima, à disseminação dos vetores e ao deslocamento cada vez maior de pessoas e animais, evidenciando a probabilidade de tornar-se um grave problema de saúde pública (Culquichicón, Cardona-Ospina *et al.* 2017, Sakkas, Bozidis *et al.* 2018).

O vírus foi isolado pela primeira vez do sangue de um paciente febril em Vegas do Oropouche, Trinidad Tobago em 1955. O primeiro isolamento no Brasil ocorreu em 1960 do sangue de uma preguiça (*Bradypus tridactylus*) capturada em uma área florestal durante a construção da rodovia Belém-Brasília e de um pool de mosquitos *Ochlerotatus serratus* capturados próximo ao mesmo local (Nunes, Martins *et al.* 2005). Um ano após ser identificado no Brasil, o OROV provocou o primeiro surto no país com aproximadamente 11.000 casos em Belém no estado do Pará (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1981, Mourão, Bastos *et al.* 2015).

O OROV é um arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* da família *Peribunyaviridae*. A família *Peribunyaviridae* é composta ainda pelos gêneros *Herbivirus*, *Pacuvirus* e *Shangavirus*. O *Orthobunyavirus* é o maior gênero da família com 88 espécies atualmente reconhecidas, dentre elas os vírus *Cache Valley*, *La Crosse* e *Schmallenberg* (ICTV, 2020) que possuem grande relevância por causar doenças em humanos e animais (Tilston-Lunel, Hughes *et al.* 2015).

1.4. Patogênese

O mecanismo de patogênese da Febre do Oropouche ainda é pouco conhecido, porém, sabe-se que o OROV é detectado no sangue desde o princípio da infecção e pode migrar gradualmente para rotas neurais, acarretando infecção sistêmica e resposta inflamatória do sistema nervoso central (SNC) (Travassos da Rosa, de Souza *et al.* 2017).

A Febre do Oropouche cursa como uma doença febril aguda e autolimitada, equivalente à DENV, com duração de 2 a 7 dias e está associada a uma variedade de sintomas como mal-estar, vômito, náusea, fotofobia, dor retro ocular, dor de cabeça, artralgia, mialgia, tontura, febre, calafrios, sinais do SNC como meningite asséptica ou meningoencefalite, sintomas hemorrágicos como sangramento espontâneo, epistaxe, petéquias e sangramento gengival e, em alguns casos, erupção cutânea acometendo geralmente os braços e tronco (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1976, Travassos da Rosa, de Souza *et al.* 2017, Sakkas, Bozidis *et al.* 2018). Além disso, alguns pacientes também manifestaram fraqueza física e perda de força (astenia) por um período de 2 a 4 semanas (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1981).

Principalmente durante grandes surtos de Febre do Oropouche, manifestações neurológicas são registradas e apresentam sintomas como rigidez na nuca, forte dor de cabeça, letargia, diplopia, tontura, nistagmo, ataxia e aumento de células no líquido cefalorraquidiano (Sakkas, Bozidis *et al.* 2018).

Embora a duração da fase aguda da doença seja de 2 a 7 dias (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1982, Romero-Alvarez, Escobar 2017), alguns pacientes tiveram reaparecimento dos sintomas na segunda ou terceira semana após os primeiros sinais da enfermidade (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1981, Azevedo, Nunes *et al.* 2007). Não há dados na literatura sobre possíveis efeitos teratogênicos do OROV.

Pesquisas têm sido desenvolvidas com objetivo de compreender como OROV atinge o SNC. Rodrigues e colaboradores (2011) observaram que a inoculação intracerebral de OROV em hamster dourado (*Mosocrites auratus*), induz

a infecção. Os autores também utilizaram a via subcutânea para inoculação, visto que esta é a via natural da infecção, no modelo, os animais desenvolveram infecção sistêmica com implicações motoras e paralisia, ao mesmo tempo elevada concentração de vírus no tecido cerebral e no fígado, indicando propagação hematogênica ao cérebro e ao fígado. Supostamente a barreira hematoencefálica é atravessada por um sistema de cavalo de Tróia, observado como um papel importante em diversas manifestações de patogênese viral. Neste sistema, o vírus é levado pela corrente sanguínea oculto dentro dos fagócitos infectados, não sendo reconhecido nos órgãos ou tecido alvo, onde então se replica, burlando o sistema imunológico (Pulzova, Bhide *et al.* 2009, Rodrigues, Santos *et al.* 2011).

Estudos desenvolvidos por Araújo e colaboradores (1978) e Rodrigues e colaboradores (2011), observaram acometimento do fígado em modelos experimentais, em humanos não há relato de hepatite em pacientes acometidos pela Febre do Oropouche, mas há relato de alteração de enzimas hepáticas (Araújo, Dias *et al.* 1978, Rodrigues, Santos *et al.* 2011, Sakkas, Bozidis *et al.* 2018).

Infecções por OROV são citolíticas com efeito citopático, estudos *in vitro* têm demonstrado a participação de proteínas virais no mecanismo de morte celular. Acrani e colaboradores (2010) demonstraram através de ensaios com células HeLa que o OROV induz a apoptose pela via intrínseca através de mecanismo acionado pela replicação viral. A replicação do vírus ativa proteínas caspases 3 e 9 e liberação do citocromo C da mitocôndria, indicando apoptose por meio da via intrínseca. Na presença de cloroquina a apoptose foi reduzida demonstrando a necessidade da produção adequada de partículas virais para que a apoptose ocorra. Os sinais de apoptose são acionados durante a replicação viral, provavelmente durante a síntese viral, indicando que uma ou mais proteínas virais possam estar envolvidas no processo (Acrani, Gomes *et al.* 2010).

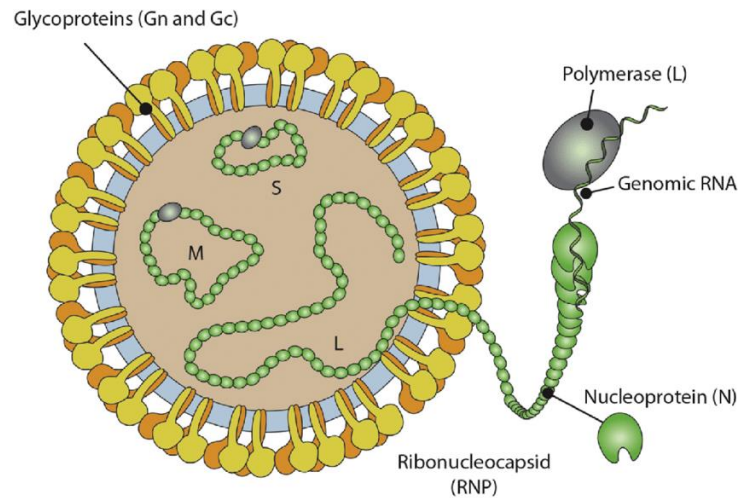
A proteína não estrutural NSs, codificada pelo segmento S do RNA viral, tem sido apontada como responsável pela indução da apoptose celular e conseqüentemente pela patogênese viral. Oliveira e colaboradores (2017) demonstraram que OROV induz a apoptose em diferentes linhagens celulares humanas 24 horas após a infecção, onde a proteína NSs induzia apoptose pela via

intrínseca com liberação do citocromo C da mitocôndria, ativação das caspases 3 e 9 e fragmentação do DNA. Também foi observado que a NSs promovia a apoptose pela via extrínseca, comprovada pela presença de caspase 8 ativada. Os autores utilizaram ainda um clone infeccioso de OROV com deleção da proteína NSs e demonstraram que na ausência desta não houve apoptose em células HeLa até 36 horas após a infecção, reafirmando assim o papel da NSs na apoptose celular. Todavia, o mecanismo pelo qual a apoptose é induzida ainda é desconhecido (Oliveira 2017).

1.5. Vírus - estrutura e estratégia de replicação

O OROV apresenta estrutura esférica com envelope de diâmetro entre 80 e 120nm e glicoproteínas de superfície inseridas na bicamada lipídica (Figura 2) (Bowden, Bitto *et al.* 2013). O genôma é composto por três segmentos de RNA fita simples de polaridade negativa – grande (L), médio (M) e pequeno (S) (Barr, Elliott *et al.* 2003). O segmento grande (L) codifica uma proteína que possui atividade de RNA polimerase para transcrição e replicação do RNA genômico. O segmento médio (M) codifica uma proteína que é clivada no retículo endoplasmático para formar as glicoproteínas de envelope Gc e Gn e ainda a proteína não estrutural NSm. O menor segmento (S) codifica duas proteínas em quadros de leitura sobrepostos, a proteína estrutural N, que faz parte do nucleocapsídeo e tem função de oligomerizar e encapsidar o genoma viral, e a proteína não estrutural NSs (Lappin, Nakitare *et al.* 1994, Bridgen, Weber *et al.* 2001, Acrani, Tilston-Lunel *et al.* 2015).

Figura 2: Organização estrutural esquemática do OROV.



Fonte: Adaptado de (Romero-Alvarez, Escobar 2018)

A proteína N desempenha função importante na montagem do vírion, por meio da interação com RdRp (RNA dependente de RNA polimerase), Gn e Gc. No decorrer do processo infeccioso ocorre a formação de compartimentos virais próximo ao complexo de Golgi, área onde as glicoproteínas virais em contato com a proteína N promovem a montagem das partículas virais (Fontana, López-Montero *et al.* 2008).

A proteína viral não estrutural NSs é o principal fator de virulência e antagoniza a resposta imune inata do hospedeiro, causando inibição global da transcrição mediada por RNA polimerase II (Bridgen, Weber *et al.* 2001, Elliott 2014).

Tilston-Lunel e colaboradores (2015) geraram um clone infeccioso de OROV a partir de cDNA, sem regiões codificadoras das proteínas NSm e NSs, e demonstraram que a proteína NSm é fundamental para a replicação do vírus em células de mamífero o mosquito e a proteína NSs é fator de virulência, agindo como antagonista de Interferon tipo I (IFN) (Tilston-Lunel, Acrani *et al.* 2015).

O vírus se liga à célula hospedeira por meio da interação das glicoproteínas virais com receptor celular, a entrada ocorre por endocitose mediada por clatrina, quando a acidificação desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana do

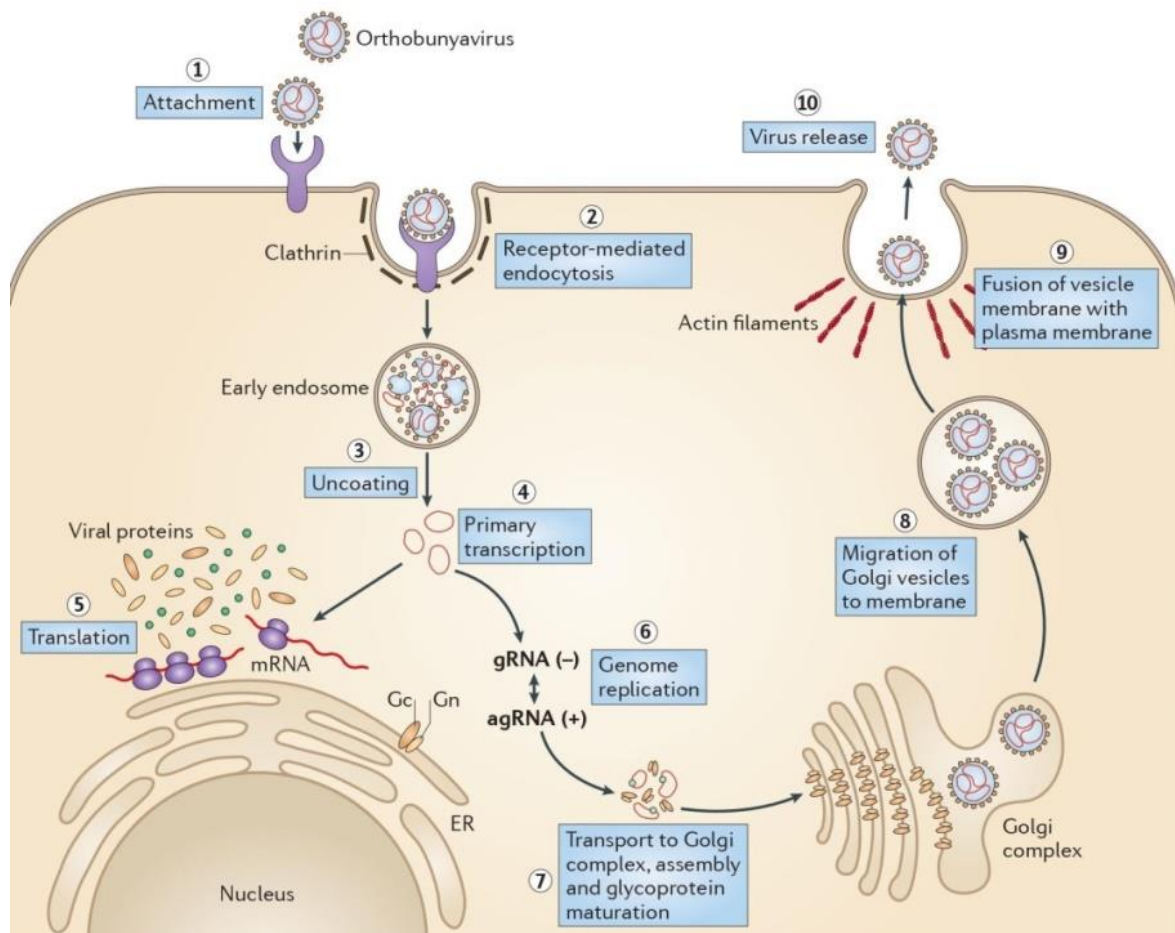
endossomo ocasionando o desnudamento dos ribonucleocapsídeos (Santos, Rodrigues *et al.* 2008).

Barbosa e colaboradores (2018) analisaram a via de montagem do ORO elucidando os fatores celulares que participam da montagem e brotamento do vírus. O OROV induz a ampliação das cisternas de Golgi, para onde componentes da célula hospedeira são recrutados para montagem dos vírions. A partir do RE as glicoproteínas Gc e Gn chegam ao complexo de Golgi onde é iniciada a formação das partículas virais nas membranas desta organela. Ali, ocorre uma associação da proteína Gn com ribonucleoproteínas virais constituída por segmentos de RNA viral, RNA polimerase e proteína nucleocapsídica N. No entanto, as proteínas virais não permanecem na região nuclear, mas se espalham em vesículas pelo citoplasma, estas vesículas são derivadas das cisternas do Golgi e formam no citoplasma fábricas virais (Barbosa, Mendonça *et al.* 2018).

A replicação viral ocorre no citoplasma das células infectadas e os vírus amadurecem pelo brotamento no complexo de Golgi. Embora a infecção de células de mamíferos geralmente resulte em morte celular, a replicação em células vetoriais de artrópodes não é citopática e essas células tornam-se persistentemente infectadas (Figura 3) (Elliott 2014).

A síntese de mRNA viral é iniciada por oligonucleotídeos tamponados que são derivados de mRNAs de células hospedeiras em um processo que é conhecido como captura de tampa. A atividade da endonuclease que é responsável pela geração dos iniciadores está contida no domínio amino-terminal da proteína polimerase RNA dependente do RNA viral (Elliott 2014).

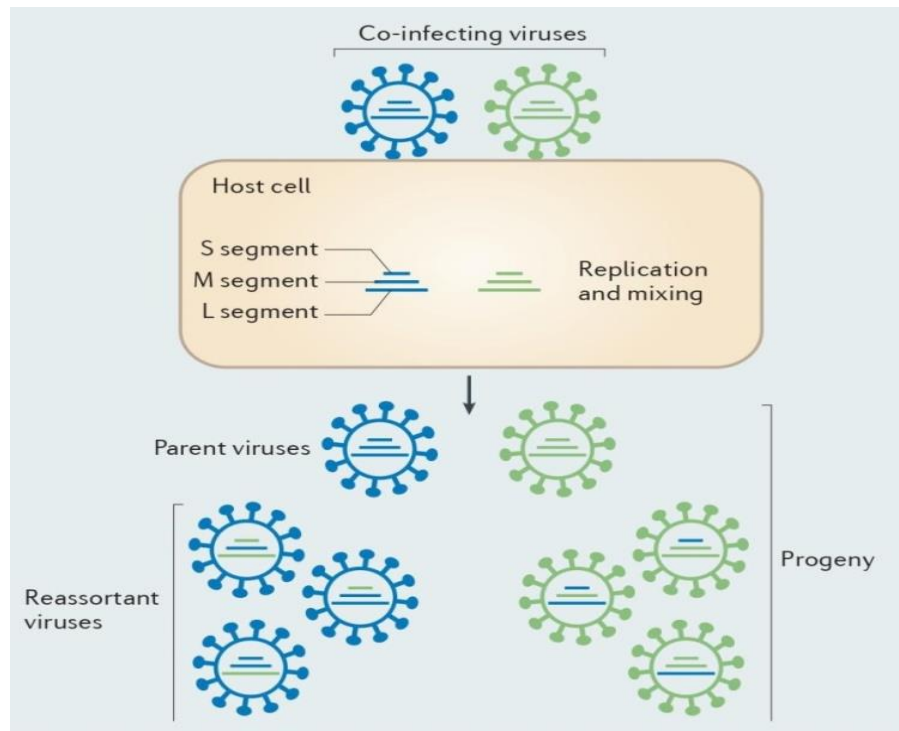
Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação de vírus da família Bunyaviridae – (1) Ligação do vírus ao receptor de membrana celular; (2) Adsorção viral mediada pelas glicoproteínas virais Gc e Gn; (3) Desnudamento do genoma viral promovido pela acidificação do endossomo; (4) Transcrição primária catalisada pela enzima RNA polimerase dependente de RNA sintetizando o mRNA; (5) Tradução do mRNA; (6) Os três segmentos de sentido negativo do genoma viral são convertidos em fitas de sentido positivo possibilitando a replicação do genoma; (7) As ribonucleoproteínas (RNP) são transportadas até as membranas do complexo de Golgi modificadas pela inserção das proteínas Gn e Gc, para formação das partículas virais; (8) Partículas virais armazenadas em vesículas no complexo de Golgi são transportadas para a superfície celular (9) filamentos de actina facilitam a fusão das membranas vesiculares com a membrana celular; (10) liberação dos virions no meio extracelular.



Fonte: (Elliott 2014)

O genoma segmentado dos *Orthobunyavirus* permite rápida evolução por meio de rearranjo de segmentos durante coinfeções. O rearranjo ocorre extensamente na natureza e os vírus que passaram por esse processo podem ter propriedades substancialmente alteradas, como aumento de virulência e adaptação a novos vetores e hospedeiros (Figura 4) (McDonald, Nelson *et al.* 2016).

Figura 4: coinfeção por vírus de genoma segmentado dando origem a rearranjos genéticos.



Fonte: (Elliott 2014).

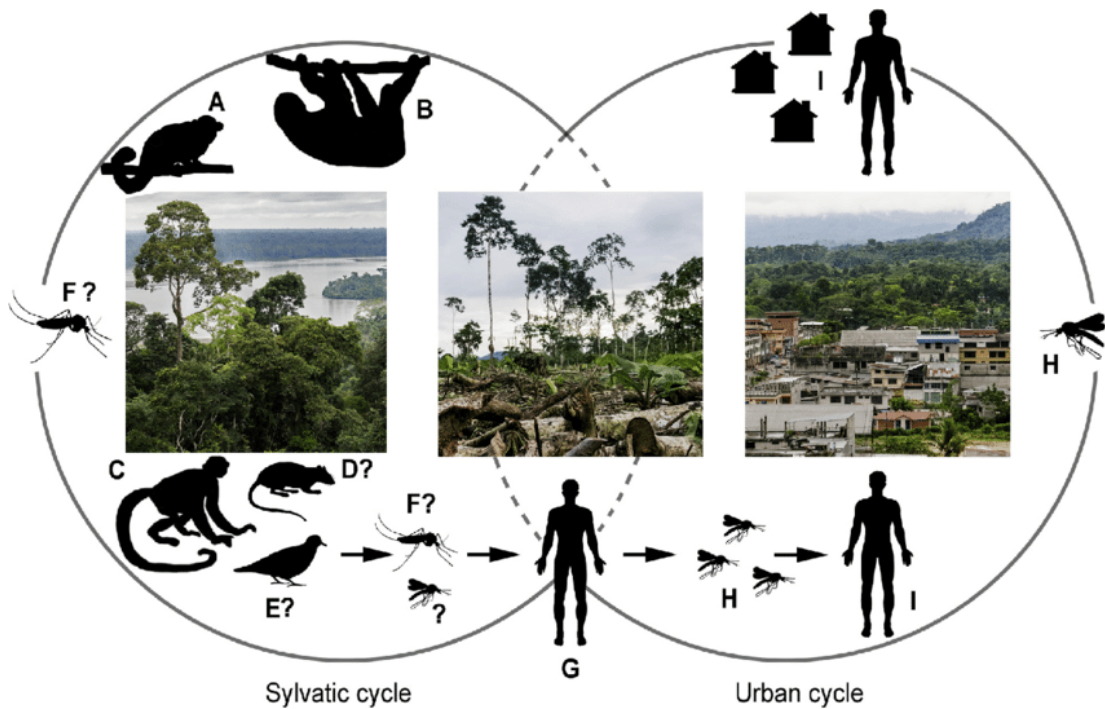
Devido a esses rearranjos, estudos filogenéticos considerando sequências completas de sRNA classificam o OROV em quatro genótipos distintos I, II, III e IV. A distribuição geográfica do vírus é referida como genótipo I em Trinidad e Tobago e Brasil; genótipo II no Panamá, Peru e Brasil; genótipo III isolado no Brasil e no Peru, e genótipo IV isolado somente no Brasil durante um surto em Manaus na década de 1980 (Figura 5) (Travassos da Rosa, de Souza *et al.* 2017).

desempenho do mosquito como vetor principal no ciclo urbano é apoiado por estudos experimentais e epidemiológicos. Pinheiro e colaboradores (1981), demonstraram que *Culicoides paraensis* transmitiram o vírus para hamsters de 6 até 12 dias após se alimentarem de sangue de pacientes contaminados, e o título que permitiu a transmissão do vírus foi considerado baixo (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1981). O fato de *Culicoides paraensis* transmitir o vírus mesmo após refeição de sangue com baixos títulos virais e a presença abundante nos locais onde ocorrem surtos, levam a crer que este é o principal vetor na transmissão do OROV (Wirth, Felipe-Bauer 1989).

Culex Quinquifasciatus também é apontado como vetor para OROV, porém Pinheiro e colaboradores demonstraram que o limiar para a infecção era considerado alto, indicando pouca competência do vetor para transmissão do vírus (Pinheiro, Rocha *et al.* 1982).

Os humanos são hospedeiros acidentais do OROV, a infecção provavelmente ocorre ao adentrar em áreas de florestas e, ao ser infectado e retornar para áreas urbanas acaba disseminando o vírus durante a fase de viremia (Travassos da Rosa, de Souza *et al.* 2017).

Figura 6: Ciclo biológico do vírus Oropouche na interface selvagem e doméstica. Mamíferos selvagens como *Callithrix penicillata* (A), *Bradypus tridactylus* (B), *Sapajus alloata* (C), *Allouatta caraya* e a possível participação de *Proechimys sp.* (D) O vírus também foi isolado de aves selvagens (E). Acredita-se que os mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* e *Aedes serratus* transmitam o vírus no ambiente selvagem (F) Perturbações antropogênicas de áreas naturais podem facilitar o transbordamento do vírus para seres humanos (G), gerando surtos em assentamentos urbanos (I). No ciclo urbano, o vírus seria transmitido pelos mosquitos *Culicoides paraensis* e *Culex Quinquemaculatus*, a participação destes vetores no ciclo de vida silvestre ainda não está clara (H).



Fonte: (Romero-Alvarez, Escobar 2018)

1.7. Diagnóstico

O fato de a Febre Oropouche apresentar sintomas semelhantes a outras arboviroses dificulta o diagnóstico clínico da doença. Leucopenia, por vezes relatada, e níveis pouco aumentados de Transaminase hepática não são suficientes para tipificar infecções por OROV e exames laboratoriais de sangue também não são úteis (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1981).

Quando há a ocorrência de sintomas neurológicos, achados provenientes do Líquido Cefalorraquidiano (LCR) como alta de proteínas, contagem de leucócitos e glicose normal a levemente reduzida são fatores que ocorrem em grande parte das infecções virais (Bastos, Figueiredo *et al.* 2012), dessa forma, é necessária a realização de testes laboratoriais específicos para comprovar a infecção por OROV.

Vários métodos são empregados para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos para OROV no diagnóstico clínico. Ensaio como Imunofluorescência Indireta (IF) em leucograma periférico (de Souza Luna, Rodrigues *et al.* 2017), teste imuno-enzimático para OROV em culturas celulares infectadas (EIA-ICC) (Mourão, Bastos *et al.* 2009), MAC Elisa, Ensaio de Neutralização (PRNT), teste de fixação do complemento (CFT) e teste Inibição de Hemaglutinação (HI) (Saeed, Nunes *et al.* 2001, Moreli, Aquino *et al.* 2002) já foram desenvolvidos e podem ser utilizados na rotina clínica. Além da metodologia sorológica, existem os métodos moleculares como a Nested RT-PCR e o One-Step RT-PCR que são utilizados para diagnóstico rápido e específico em amostras de soro e LCR (Moreli, Aquino *et al.* 2002), (Naveca, Nascimento *et al.* 2017). Além disso, o sequenciamento genético também pode ser uma das ferramentas utilizadas na identificação do OROV, é utilizado como diagnóstico em isolados clínicos quando os métodos de amplificação convencionais baseados em sequências conhecidas se mostram ineficazes (Hang, Forshey *et al.* 2012).

1.8. Epidemiologia

A distribuição geográfica do OROV inclui países como Panamá, Equador, Peru, Argentina, Colômbia, Venezuela e Brasil. A presença do vírus foi registrada como surtos, casos esporádicos, ou ainda a detecção do vírus por meio de investigação sorológica em humanos e animais, pelo menos 30 epidemias foram registradas nos últimos 60 anos acometendo mais de 500.000 pessoas (Sakkas, Bozidis *et al.* 2018).

Em 1961, apenas um ano após a identificação do OROV no Brasil, o primeiro surto da doença foi registrado em Belém no estado do Pará, com cerca de 11.000 casos notificados (Pinheiro, 1962). A partir de então, diversos surtos explosivos de febre do OROV foram relatados no país acometendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins (Pinheiro, Travassos da Rosa *et al.* 1981, Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.* 1989, Tesh 1994, Nunes, Martins *et al.* 2005).

Em outras regiões do país, casos foram notificados em diversos municípios no estado do Mato Grosso nos anos 2011 e 2012 (Cardoso, Serra *et al.* 2015). Em 2010 dois casos foram relatados em Ribeirão Preto/SP em um dos casos o paciente teria contraído a doença durante viagem ao estado de Rondônia, o outro teria se infectado durante viagem a Porto Seguro/BA. A identificação do OROV foi realizada através da detecção dos três segmentos genômicos do OROV pela RT-PCR TaqMan no sangue de ambos os pacientes (de Souza Luna, Rodrigues *et al.* 2017). Em 2016 também em Ribeirão Preto, um caso de meningoencefalite asséptica por OROV foi relatado, o paciente apresentou sintomas como febre alta súbita, cefaléia intensa em um dos lados, vômitos, fotofobia intensa, rigidez do pescoço e confusão após retornar de viagem à Ilha Mosqueiro, no norte do Brasil, o diagnóstico foi realizado por meio de exame de imagem e RT-PCR da fração S do OROV (Vernal, Martini *et al.* 2019).

Dois casos foram relatados no estado da Bahia em 2017, num dos casos o paciente residia na região metropolitana de Salvador teve os primeiros sintomas quando estava na cidade de Cachoeira/BA, no segundo caso o paciente residia em Salvador, mas tinha histórico de viagem não sendo possível precisar onde ocorreu o contágio, a identificação do OROV foi realizada através da técnica de RT-PCR (Secretaria da Saúde de Salvador/BA, 2017).

Em 2021 houve o relato de um caso de infecção por OROV em Teresina no Piauí, o diagnóstico foi confirmado por meio de teste de inibição da hemaglutinação”, ELISA-IgM e RT-PCR. O paciente teria se infectado na própria cidade, indicando a circulação do vírus no estado do Piauí (Secretaria da Saúde de Teresina/PI, 2021).

Evidências sorológica também registraram a presença do vírus em amostra isolada a partir de um primata (*Callithrix penicillata*) na região de Arinos, estado de Minas Gerais, no ano 2000 (Nunes, Martins *et al.* 2005) e em 2002 um estudo com aves no Parque Nacional da Lagoa do Peixe no Rio Grande do Sul detectou a presença de anticorpos para OROV em quatro aves, sendo três residentes no país e uma migratória, evidenciando assim que a migração de aves pode ser uma forma de dispersão do vírus (Secretaria da Saúde/RS, 2003). Em 2012 e 2013 estudos

epidemiológicos identificaram a presença de anticorpos contra OROV em primatas nos municípios de Bonito e Miranda, no Mato Grosso do Sul, sugerindo a circulação do vírus na região (Batista, Andreotti *et al.* 2012, Batista, Andreotti *et al.* 2013). Em 2016 um estudo epidemiológico com primatas capturados em parques aos arredores de Goiânia/GO mostrou que animais possuíam imunidade contra o OROV, indicando que os animais já foram contaminados pelo vírus (Gibrail, Fiaccadori *et al.* 2016).

Na América Central, em 1989 o Panamá registrou surtos de Febre do Oropouche em Bejuco, Chilibre e San Miguelito (Tesh, 1994). Na América do sul, em 2016, o registro de um caso de Febre do Oropouche no Equador (Wise, Pullan *et al.* 2018) levou a um estudo considerando 96 pacientes febris, destes, seis deram positivo para OROV. As sequências genômicas foram comparadas com as sequências disponíveis publicamente e foi observado que os casos equatorianos são geneticamente distintos, sugerindo a transmissão local do vírus (Wise, Márquez *et al.* 2020).

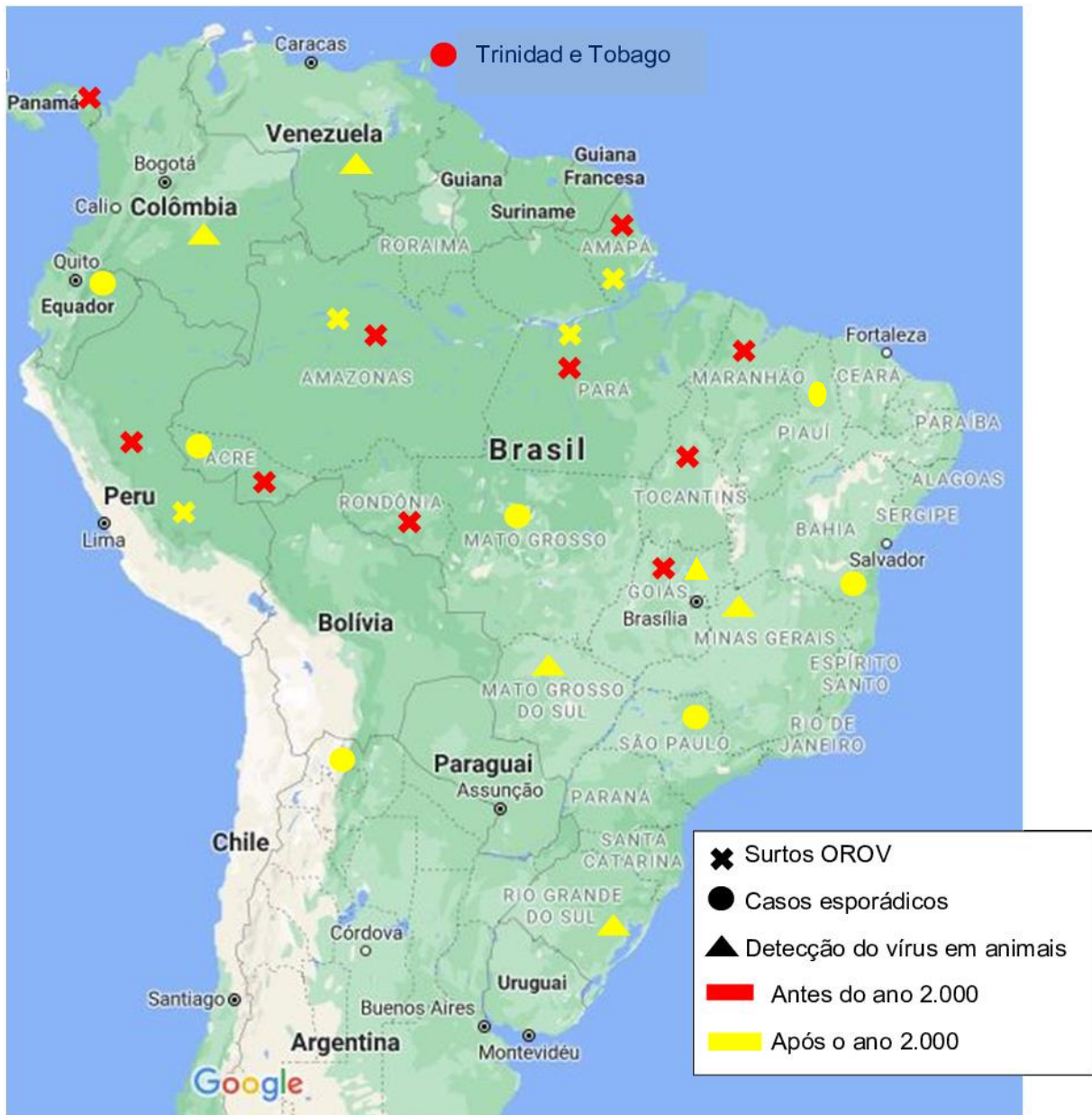
No Peru, sugeriu-se que o OROV chegasse ao país através na mobilização humana pelas margens do rio Amazonas, a doença foi detectada no país pela primeira vez 1992 e a partir de então, casos de febre do OROV foram relatados continuamente no país (Romero-Alvarez, Escobar 2017, Romero-Alvarez, Escobar 2018). Na Argentina o genoma e anticorpos IgM foram detectados a partir de amostras de soro de cinco pacientes com síndrome febril inespecífica na província de Jujuy em 2005, na Colômbia OROV foi detectado em primatas, embora nenhum caso em humanos tenha sido relatado (Romero-Alvarez, Escobar 2018) e na Venezuela, em 2010, um estudo obteve a sequência completa de um rearranjo genético do OROV a partir de amostra de macaco (*Cebus Schomburgk*) (Navarro, Giambalvo *et al.* 2016).

O fato da Febre do Oropouche possuir sintomas semelhantes a outras doenças febris, como dengue e leptospirose, e de que testes nos locais de atendimento ainda serem incomuns, levam a suspeita de que o número de casos da doença ainda sejam subnotificados (Gutierrez, Wise *et al.* 2020).

No Brasil, embora a ocorrência do OROV seja predominante na região Norte, evidências mostram o potencial de disseminação do vírus para outras regiões do país. O fato de muitas pessoas viajarem para regiões de grande prevalência do OROV juntamente com ampla distribuição do vetor *Culicoides paraensis*, além de desmatamentos, mudanças climáticas e mudanças no habitat de insetos e animais que mantem o ciclo silvestre do vírus podem facilitar a disseminação, principalmente em locais densamente povoadas como a região Sudeste (Saúde 2003, de Souza Luna, Rodrigues *et al.* 2017). Febre do Oropouche é uma das doenças febris mais importantes do Brasil e tem sido apontada como doença candidata para uma próxima epidemia nas Américas (Rodriguez-Morales, Paniz-Mondolfi *et al.* 2016, Romero-Alvarez, Escobar 2018).

Inicialmente as infecções por OROV se concentravam principalmente na região Norte do Brasil, países mais ao Norte da América do Sul e América Central, porém, observando a notificação de casos, percebe-se que nos últimos 20 anos o vírus migrou para outras regiões do Brasil e da América do Sul (figura 7), reforçando a indicação de especialistas de que o OROV pode ser o agente de uma próxima epidemia nas Américas.

Figura 7: Mapa de distribuição do OROV.



Fonte: Autoria própria

1.9. Tratamento

Não há vacina ou tratamento específico para Febre do Oropouche, apenas medicamentos para alívio dos sintomas são utilizados. A doença apresenta bom prognóstico e até o momento não tem registro na literatura de morte provocada por OROV (Sakkas, Bozidis *et al.* 2018). Pesquisas de possíveis fármacos que inibam o vírus são limitados, Livonesi e colaboradores (2006) realizaram estudo com a

ribavirina, porém os resultados sugerem que a mesma não possui atividade antiviral contra o OROV (Livonesi, De Sousa *et al.* 2006), em outro estudo, os mesmos autores observaram resultados positivos com IFN- α apenas na prevenção da Febre do Oropouche (Livonesi, de Sousa *et al.* 2007). Dessa forma a prevenção baseia-se somente em medidas de controle do vetor e proteção pessoal como uso de repelentes e roupas que inibam a picada do mosquito.

Visto que nos últimos anos o OROV tem se espalhado pela América do Sul sendo apontado como candidato a uma próxima epidemia, e dada à ausência de um tratamento antiviral específico, há a necessidade de estudos na pesquisa de moléculas com potencial para o tratamento da Febre do OROV.

1.10. Atividade biológica das Acridonas

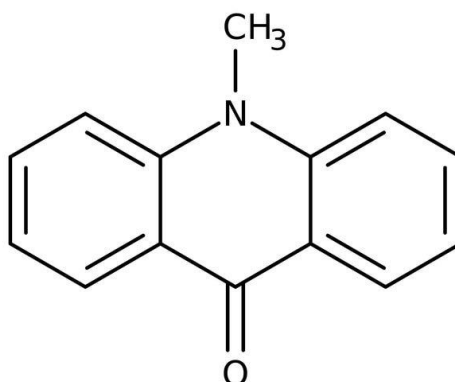
A elaboração de compostos sintéticos com estrutura baseada em compostos naturais tem sido amplamente utilizada, por facilitar a triagem na busca por moléculas com potencial farmacológico e por permitir a produção em grande escala e de forma sustentável (Butler 2008). Embora os compostos naturais tenham massa molar menor, o que facilita a absorção, comparada aos derivados obtidos em laboratório (Ganesan 2008, Dev 2010), a escolha pelos sintéticos ocorre devido à maior facilidade de obtenção e também pela impossibilidade de patentear uma molécula advinda de fonte natural, o que inviabilizaria a comercialização como fármaco pela indústria farmacêutica.

Ademais, a partir de combinação química é possível à criação de bibliotecas de novos compostos, oportunizando a descoberta de moléculas biologicamente ativas em tempo reduzido e a viabilidade de alterações químicas que possam aperfeiçoar sua atividade biológica, reduzir a toxicidade, dentre outras características passíveis de alterações (Singh, Barrett 2006, Rishton 2008).

As acridonas são compostos orgânicos derivados de acridinas. Seu modo de ação é atribuído principalmente à intercalação do DNA e aos efeitos consecutivos

nos processos biológicos ligados ao DNA e suas enzimas correlacionadas (Kaur, Singh 2011, Zhang, Li *et al.* 2014).

Figura 8: Estrutura básica das acridonas.



Fonte: National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 2015, Acridone, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acridone>.

Os derivados de acridinas são largamente estudados para tratamento de diversas doenças como câncer, Alzheimer, infecções bacterianas, virais e por protozoários (Kaur, Singh 2011, Galdino-Pitta, Pitta *et al.* 2013, Zhang, Li *et al.* 2014). Pesquisas com acridonas demonstraram sua atividade como inibidor do vírus HCV, atuando na inibição da transcrição pela intercalação nas moléculas de RNA, agindo sobre a enzima viral helicase NS3 (Manfroni, Paeshuyse *et al.* 2009, Stankiewicz-Drogoń, Dörner *et al.* 2010).

Age também como inibidor na replicação dos vírus citomegalovírus (CMV) e herpes simplex tipo 2 (HSV-2) e inibe a transcrição do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)(Yamamoto, Furukawa *et al.* 1989, Turpin, Buckheit *et al.* 1998, Fujiwara, Okamoto *et al.* 1999). Até o momento não há estudos publicados que indiquem a atividades antiviral contra o OROV desta classe de compostos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antiviral de compostos derivados de acridonas no ciclo replicativo do OROV.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar a citotoxicidade das acridonas na linhagem celular VERO/E6 e estabelecer as concentrações viáveis para os ensaios antivirais;
- b) Avaliar a capacidade de inibição da replicação viral dos compostos in vitro através das técnicas de ensaio de redução de placas, ensaio virucida e como pré-tratamento e imunofluorescência.

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese de compostos

Este estudo utilizou um painel de 11 acridonas (FAC2-FAC7, FAC15-FAC17 E FAC20-22) (figura 9), sintetizadas no Laboratório de Química Verde e Medicinal (LQVM) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto e foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luis Octávio Regasini.

Figura 9: Estrutura química dos derivados de acridona utilizados neste estudo.

CÓDIGO	FM	PM	ESTRUTURA QUIMICA
FAC-2	$C_{14}H_{11}NO_4$	257,07	
FAC-4	$C_{13}H_9NO_4$	243,05	
FAC-5	$C_{13}H_9NO_4$	243,05	
FAC-6	$C_{18}H_{19}NO_5$	345,12	
FAC-7	$C_{17}H_{17}NO_5$	315,11	
FAC-15	$C_{16}H_{18}NO_5$	317,09	
FAC-16	$C_{19}H_{21}NO_4$	327,15	
FAC-17	$C_{15}H_{13}NO_3$	255,09	
FAC-20	$C_{13}H_9NO_2$	211,06	
FAC-21	$C_{18}H_{19}NO_5$	345,12	
FAC-22	$C_{17}H_{17}NO_3$	277,07	

Fonte: Laboratório de Química Verde e Medicinal (LQVM) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

3.2. Linhagens celulares

Foram utilizadas células C6/36, clones celulares de larvas de *Aedes albopictus*, para a preparação do estoque viral, mantidos em Meio Leibovitz (L15 - acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino – SFB - 100U/mL de Penicilina e 100µg/mL de Estreptomicina) e células VERO (Células diplóide de rim de Macaco Verde Africano, clone E6), gentilmente cedidas pelo Prod. Dr. Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira (Famerp/São José do Rio Preto), mantidas em Meio Eagle's Minimum Essential (MEM - acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino – SFB - 100U/mL de Penicilina e 100µg/mL de Estreptomicina), à temperatura de 37°C com 5% de CO₂, em ambiente humidificado, para a realização dos ensaios.

3.3. Produção Viral

O OROV (BeAn 19991) utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira - Laboratório de Pesquisas em Virologia FAMERP, São José do Rio Preto/SP.

Estoques virais foram propagados em linhagem celular C6/36, conforme metodologia descrita por Figueiredo (1990). Para tanto, monocamadas de células C6/36, com aproximadamente 90% de confluência, foram infectadas com OROV por 1 hora a 28°C e incubadas por sete dias com meio de manutenção (L15 - acrescido de 1% de Soro Fetal Bovino – SFB - 100U/mL de Penicilina e 100 µg/mL de Estreptomicina).

Após período de incubação, as garrafas foram congeladas a -80°C por período de 48 horas, para que ao descongelar houvesse o rompimento das células e liberação dos vírus no sobrenadante. Logo após, a suspensão contendo vírus e células foi centrifugada por 5 minutos a 3.000rpm para separação dos detritos celulares e os sobrenadantes foram alíquotados e congelados a -80°C para posterior titulação viral.

3.4. Titulação Viral

A titulação viral foi realizada através do Ensaio de Placas de lise, o qual utiliza meio semissólido e evita formação de placas secundárias, infectando somente as células adjacentes e assegurando que cada placa formada no teste seja proveniente de uma partícula viral infecciosa do inoculo inicial (Lennette 1995).

Para tanto, 200µL de diluições seriadas de razão 10 (10^{-2} a 10^{-6}) da suspensão de OROV proveniente de cultura celular foram inoculadas em células aderidas em microplacas de 24 cavidades. Cada diluição, incluindo o controle negativo (sem vírus), foi inoculada em quadruplicada. Uma hora após a incubação, o inoculo viral foi removido para adição de 1mL/cavidade da mistura (v/v) de Carboximetilcelulose (CMC) 2% e meio de manutenção concentrado 2X.

As células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ e observadas diariamente. Após cinco dias, a mistura foi removida para fixação das células vivas com solução de Paraformaldeído a 4%. Solução de Cristal Violeta a 1% foi adicionada para visualização e contagem das placas.

Por último, foi calculado o título de infectividade expresso pelo número de unidades formadoras de placas (PFU) e, portanto, de partículas virais, já que cada placa formada é iniciada pela infecção de uma partícula viral infectante.

3.5. Avaliação da Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em células VERO utilizando o ensaio colorimétrico do MTT (Brometo de Azul de Tiazolil Tetrazólio, Sigma–Aldrich, Germany).

Monocamadas de células VERO/E6 foram aderidas em microplaca de 96 cavidades e expostas a diferentes concentrações dos compostos (300uM, 150uM, 75uM, 37,5uM, 18,75uM, 9,37uM, 4,68uM e 2,34uM) por 5 dias à temperatura de 37°C com 5% de CO₂. Após incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido para a adição de 100µL de meio de cultura acrescido de MTT (1 mg/mL). As placas foram novamente incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 1 hora. Após

este período, o sobrenadante foi retirado e adicionado 100µL de DMSO (Merck) para a solubilização dos cristais formazan. A placa foi agitada por 10 minutos e realizada a leitura no espectrofotômetro a LT-4000 Microplatereader (LabTech) a 540nm. A concentração dos compostos que apresentaram viabilidade celular acima de 80% foram selecionados para os ensaios antivirais.

3.6. Avaliação da inibição da replicação viral em células tratadas segundo inibição do número de placas

Monocamada de células VERO/E6, aderidas em microplacas de 24 cavidades, foram inoculadas com 25 PFUs/cavidade de suspensão viral. Após uma hora de infecção, o inoculo foi substituído por 1ml de meio de cultura contendo 2% de CMC e os compostos selecionados. As células foram incubadas a 37°C, com 5% CO₂, durante 5 dias e, em seguida, fixadas e coradas. Foi realizado o cálculo da média e o desvio padrão do número de placas obtidas para cada grupo de células tratadas ou não tratadas, para análise da inibição da replicação viral. Após esta primeira avaliação, os compostos que apresentaram percentuais de inibição maior que 70% foram considerados os promissores para a continuidade do trabalho.

3.7. Avaliação da atividade virucida

Para avaliação da ação direta dos compostos selecionados sobre as partículas virais, suspensões virais (25PFU) foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos selecionados em tubo de 1,5mL à 37°C durante uma hora. Após este período, as suspensões tratadas foram adicionadas a monocamadas de células VERO/E6 e incubadas por 1 hora. O sobrenadante foi então removido e adicionado meio semissólido com 1% de SFB e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 5 dias. Após período de incubação, as células foram fixadas, coradas e quantificadas para a análise de ação virucida conforme número de placas de lise.

3.8. Avaliação da atividade antiviral como pré-tratamento

Para avaliar a atividade antiviral dos compostos impedindo a replicação do vírus nas células, suspensão com os compostos foram adicionadas a monocamada celular e incubados na estufa a 37°C, 5% CO₂ por 1 hora, transcorrido esse tempo a suspensão foi removida e a monocamada celular lavada com PBS por duas vezes, em seguida as células desafiadas com 1,0 MOI de OROV durante 48 horas. Transcorrido esse período foi realizado imunofluorescência.

3.9. Avaliação da atividade antiviral por imunofluorescência

Monocamada de células VERO/E6, aderidas em microplacas de 24 cavidades, foram inoculadas 1,0 MOI de suspensão viral. Após uma hora de infecção, o inoculo foi substituído por 1mL de meio de cultura contendo 1% de SFB e os compostos selecionados.

As células foram incubadas a 37°C, com 5% CO₂, durante 48 horas e, em seguida, o meio de cultura foi aspirado e adicionado, para fixar, solução de paraformaldeído até cobrir a monocamada e incubado a T.A. por 20 min, após este procedimento, foi lavado 2 vezes com PBS 1x.

Para permeabilização das células, foi adicionado Triton X – 100 1% em PBS e incubado por 2 min. T.A., após isso foi lavado 2 vezes com PBS 1x. Para bloqueio, utilizou-se 10% soro de bode T.A. e incubado 10 min.T.A., em seguida o anticorpo primário anti-OROV (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Nikolaos Vasilakis, UTMB) foi diluído em PBS 1x + 10% soro de bode, e adicionado 200UµL para cobrir a monocamada e incubado overnight 4°C em câmara úmida, no dia seguinte, foi lavado três vezes com PBS 1X durante 5 min. sob agitação e adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 ou 555 em Diluição: 1:1000 em 10% soro de bode e incubado por 1 hora, 37°C em câmara úmida (protegido da luz).

Após este período, foram novamente lavadas com PBS 1X durante 5 min. sob agitação por três vezes, após isso foi lavado 1x com água e iniciou-se a lavagem

com Dapi durante 5 min. com a solução diluída a T.A., depois a solução foi retirada e adicionou-se água para posterior leitura.

3.10. Análise dos resultados

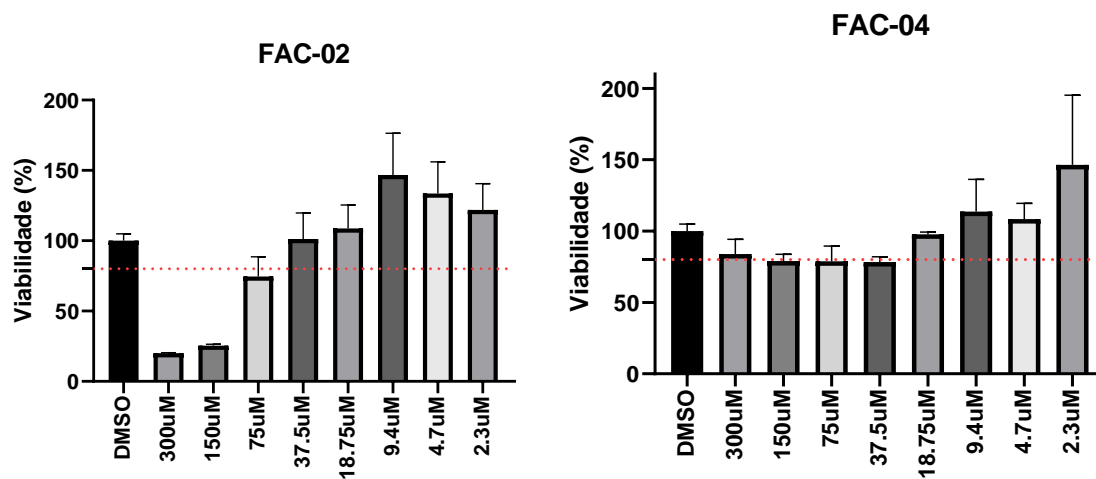
Os dados gerados nas leituras das amostras foram avaliadas utilizando o software GraphPad Prism 8, normalizando-os por sua divisão pelos valores das amostras controle contendo somente DMSO ou controle viral e multiplicando por cem, para obter valores em porcentagem e elaboração dos gráficos.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da Citotoxicidade

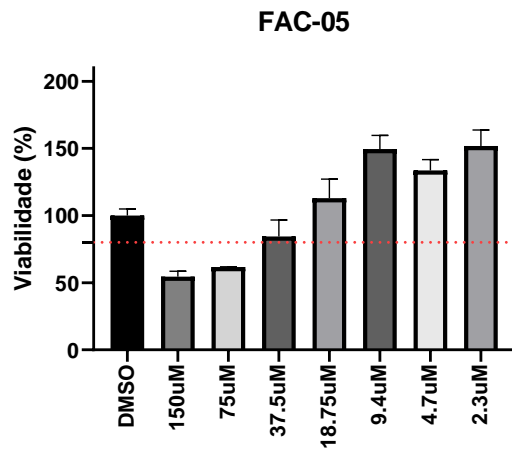
Os compostos FAC04 e FAC07 demonstraram atividade celular em todas as concentrações testadas (300uM, 150uM, 75uM, 37,5uM, 18,75uM, 9,37uM, 4,68uM e 2,34uM) , na concentração de 37,5uM, os compostos FAC02, FAC05, FAC17, FAC20 e FAC21 apresentaram viabilidade celular acima de 80%, os compostos FAC06 e FAC22 apresentaram viabilidade celular de 80% na concentração 75uM e a FAC16 mostrou-se tóxica em todas as concentrações.

Figura 10: Gráfico da análise de citotoxicidade das acridonas.

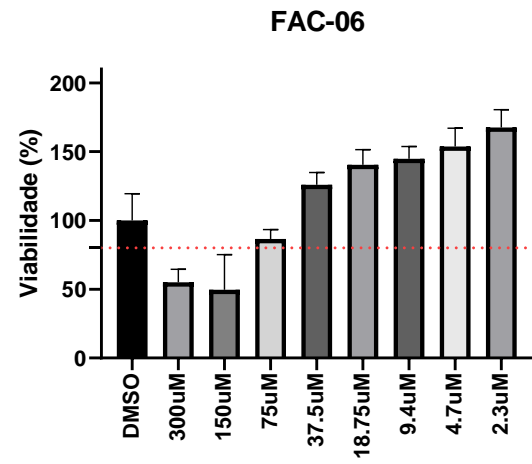


Fonte: Autoria própria

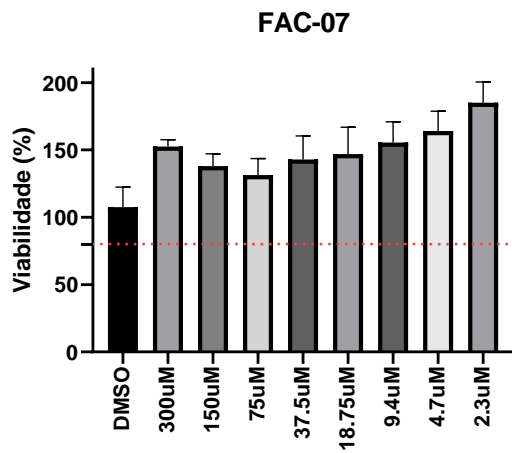
Fonte: Autoria própria



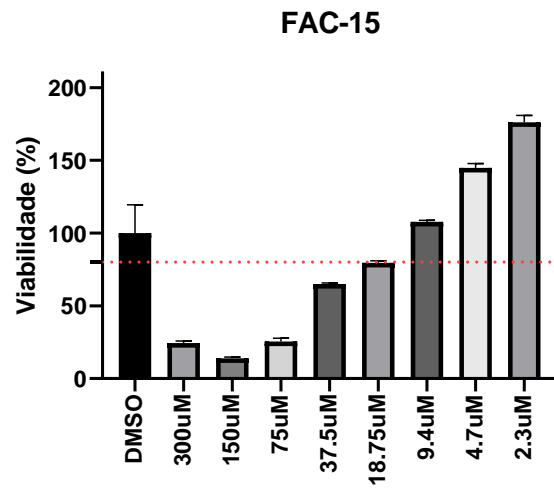
Fonte: Autoria própria



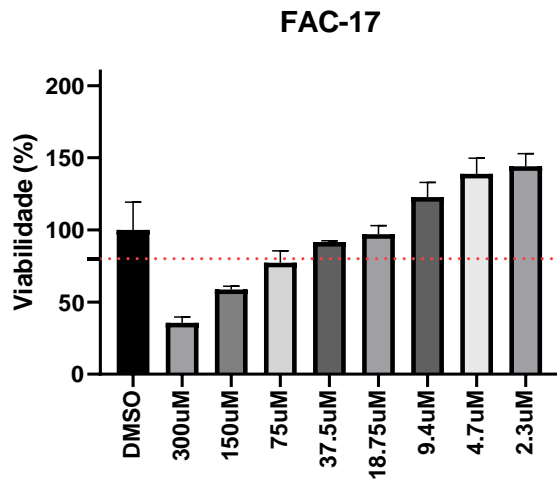
Fonte: Autoria própria



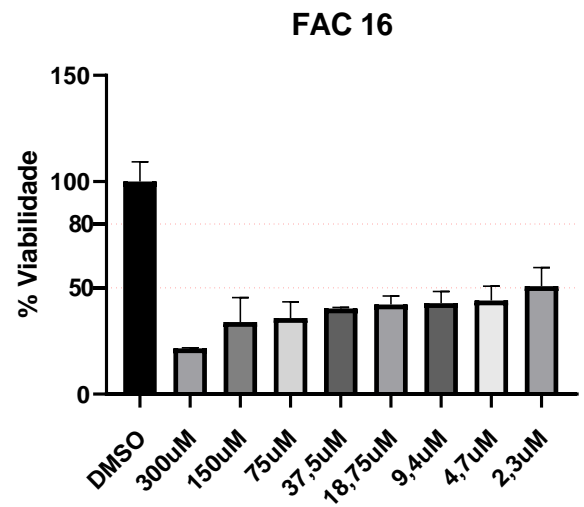
Fonte: Autoria própria



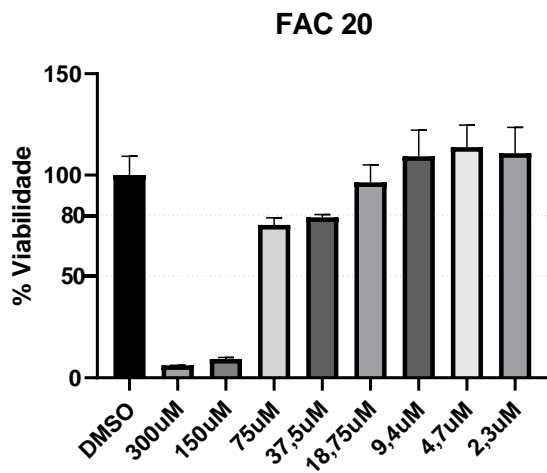
Fonte: Autoria própria



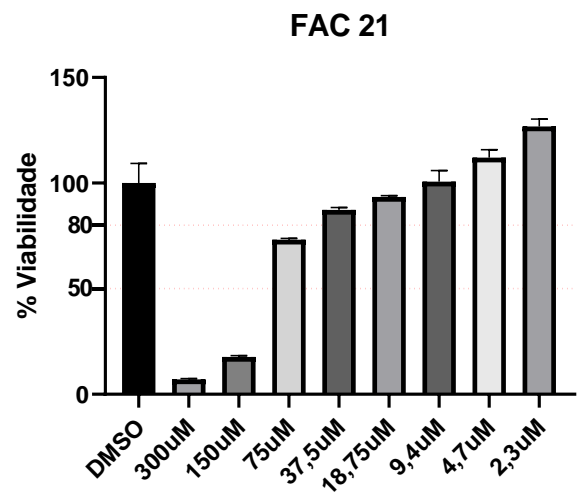
Fonte: Autoria própria



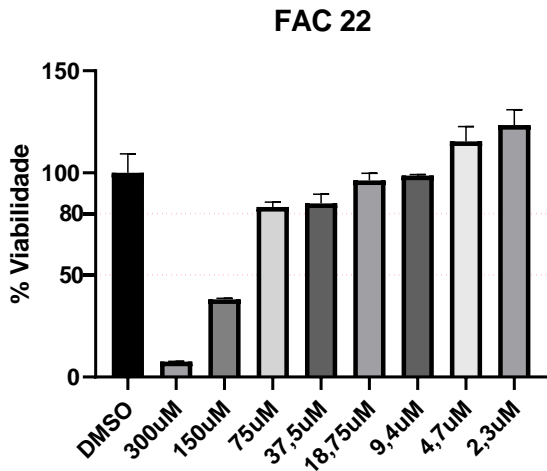
Fonte: Autoria própria



Fonte: Autoria própria



Fonte: Autoria própria

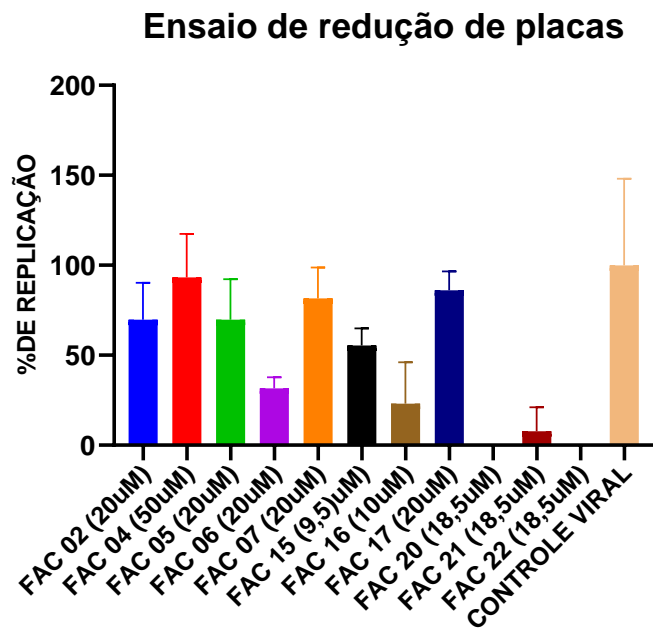


Fonte: Autoria própria

4.2. Avaliação da inibição da replicação viral em células tratadas segundo inibição do número de placas

Neste ensaio, as FAC20 e FAC22 inibiram completamente a replicação viral não havendo formação de placas, já a FAC21, mostrou redução de 90%, enquanto a FAC16 reduziu aproximadamente 75% a formação de placas.

Figura 11: Avaliação da inibição da replicação viral em células tratadas segundo inibição do número de placas.

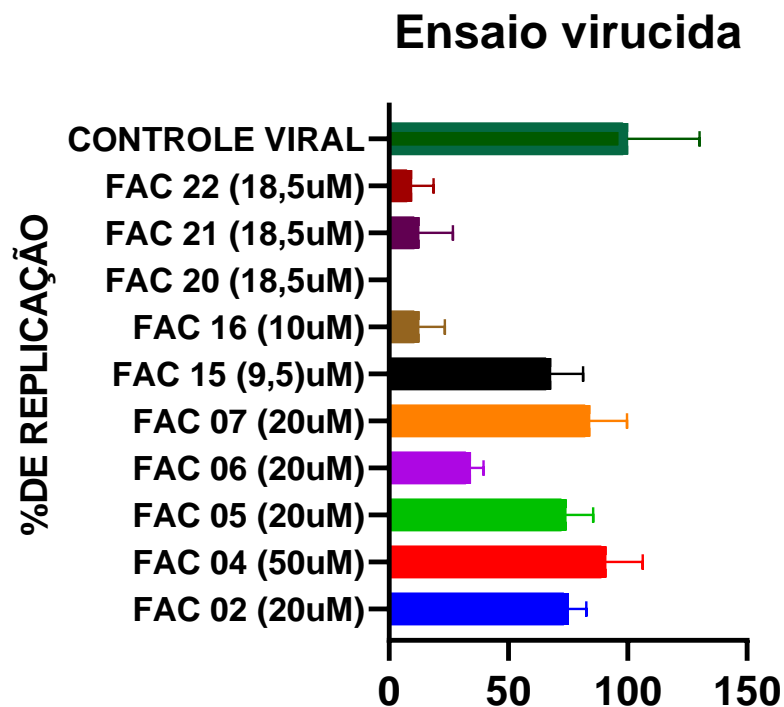


Fonte: Autoria própria

4.3. Avaliação da atividade virucida

Neste ensaio, a FAC20 inibiu completamente a formação de placas, já as FAC16 e FAC21 inibiram aproximadamente 85% a formação de placas e a FAC22 mostrou redução de 90% na formação de placas.

Figura 12: Gráfico da avaliação da atividade virucida.

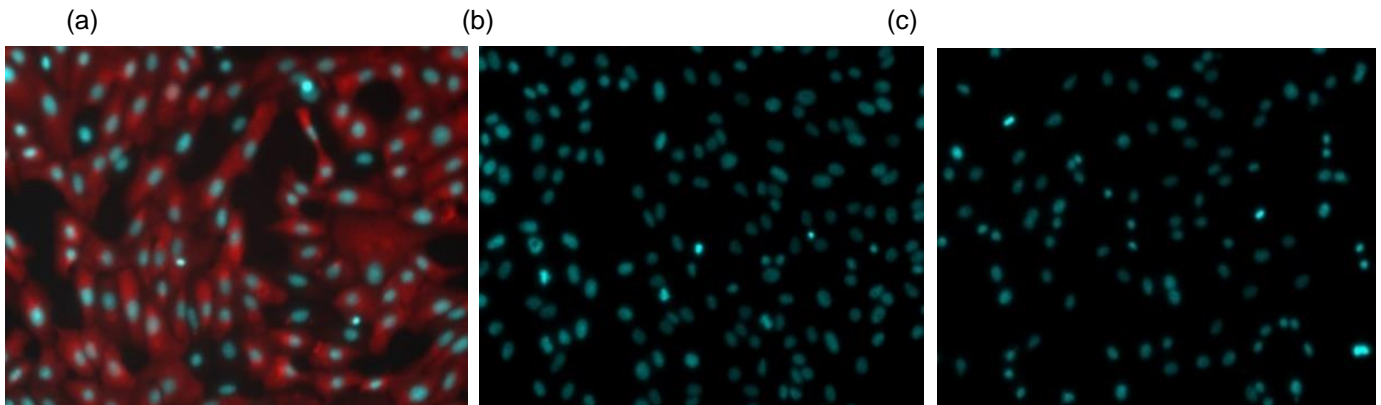


Fonte: Autoria própria

4.4. Avaliação da atividade antiviral por imunofluorescência

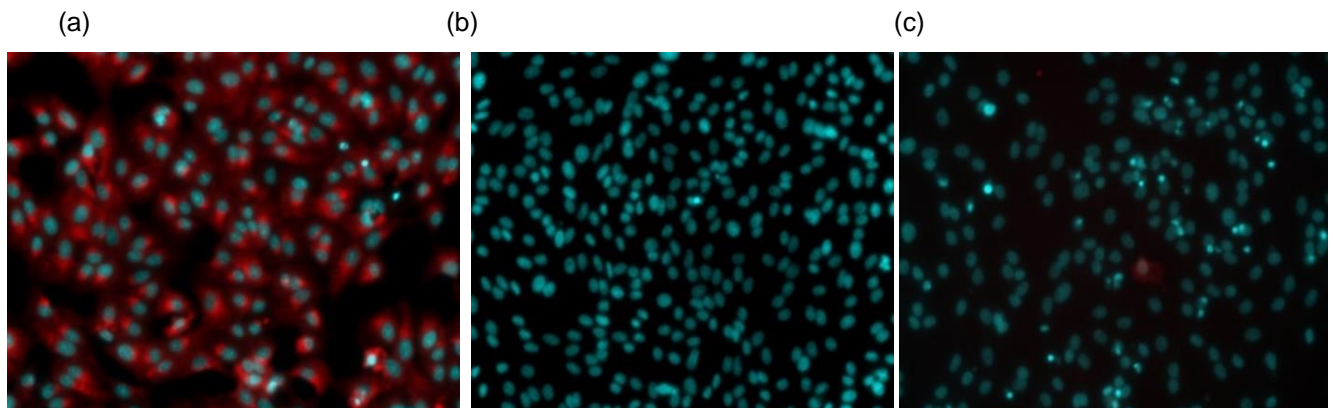
Células desafiadas com OROV e posteriormente tratadas com os compostos foram analisadas quanto à intensidade de imunofluorescência.

Figura 13: Imunofluorescência das células infectadas com OROV e tratadas com FAC16. Células desafiadas com 1,0 MOI de OROV e tratadas com FAC16 na concentração 10,0uM, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas e tratadas com FAC16. Aumento de 20x.



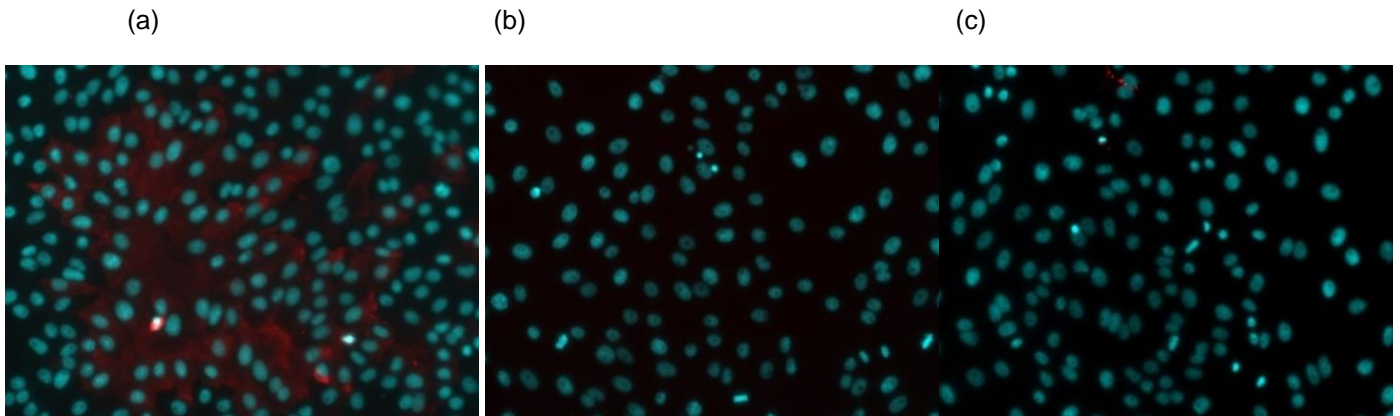
Fonte: Autoria própria

Figura 14: Imunofluorescência das células infectadas com OROV e tratadas com FAC16. Células desafiadas com 1,0 MOI de OROV previamente exposto por 1h à solução contendo FAC16 na concentração 10,0uM, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC16. Aumento de 20x.



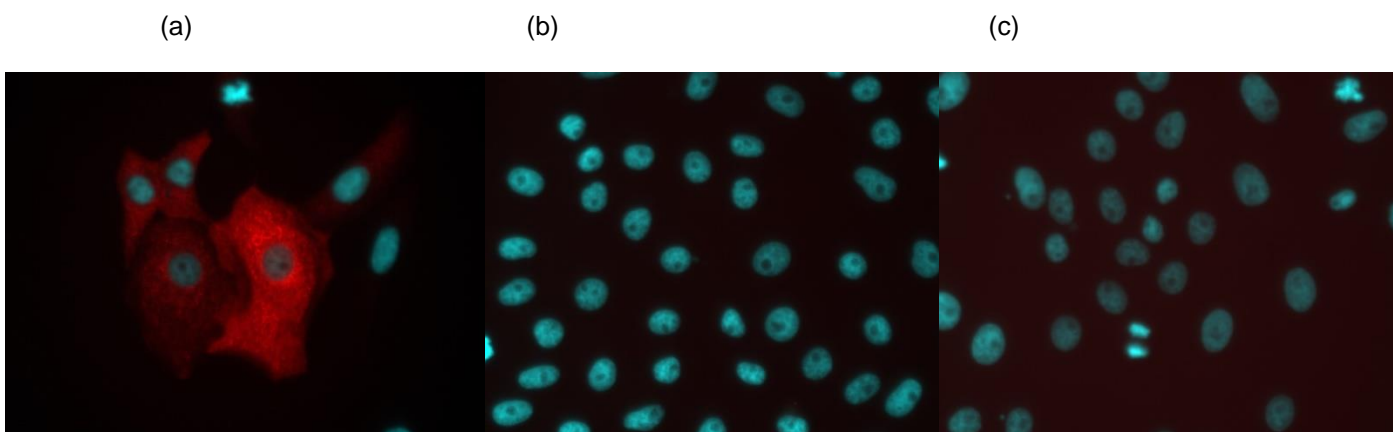
Fonte: Autoria própria

Figura 15: Imunofluorescência das células infectadas com OROV e tratadas com FAC20. Células desafiadas com 1,0 MOI de OROV e tratadas com FAC20 na concentração 18,5uM, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas e tratadas com FAC20. Aumento de 20x.



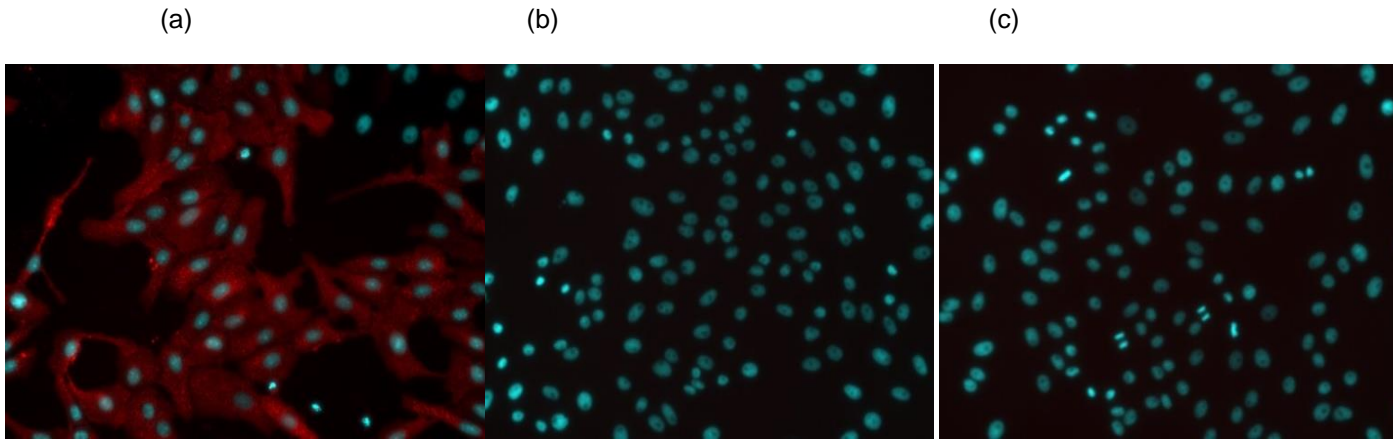
Fonte: Autoria própria

Figura 16: Imunofluorescência das células infectadas com OROV e tratadas com FAC20. Células desafiadas com 1,0 MOI de OROV previamente exposto por 1h à solução contendo FAC20 na concentração 18,5uM, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC20. Aumento de 40x.



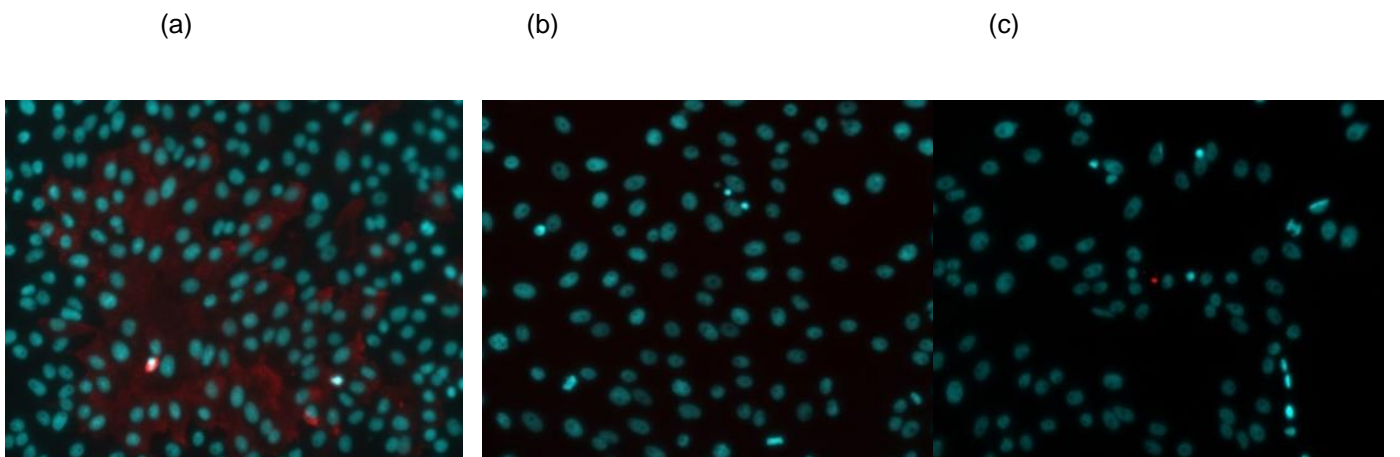
Fonte: Autoria própria

Figura 17: Imunofluorescência das células previamente tratadas com a FAC20 e posteriormente infectadas com OROV. Células foram expostas a FAC20 na concentração 18,5uM e após 1 hora desafiadas com 1,0 MOI de OROV, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC20. Aumento de 20x.



Fonte: Autoria própria

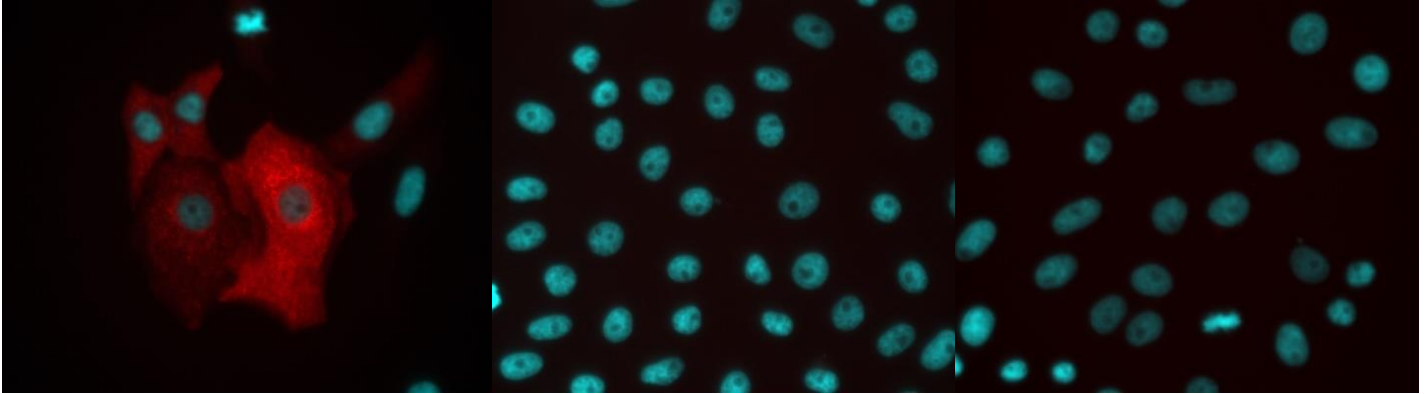
Figura 18: Imunofluorescência das células infectadas com OROV e tratadas com FAC21. Células desafiadas com 1,0 MOI de OROV e tratadas com FAC21 na concentração 18,5uM, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas e tratadas com FAC21. Aumento de 20x.



Fonte: Autoria própria

Figura 19: Imunofluorescência das células infectadas com OROV e tratadas com FAC21. Células desafiadas com 1,0 MOI de OROV previamente exposto por 1h à solução contendo FAC21 na concentração 18,5uM, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC21. Aumento de 40x.

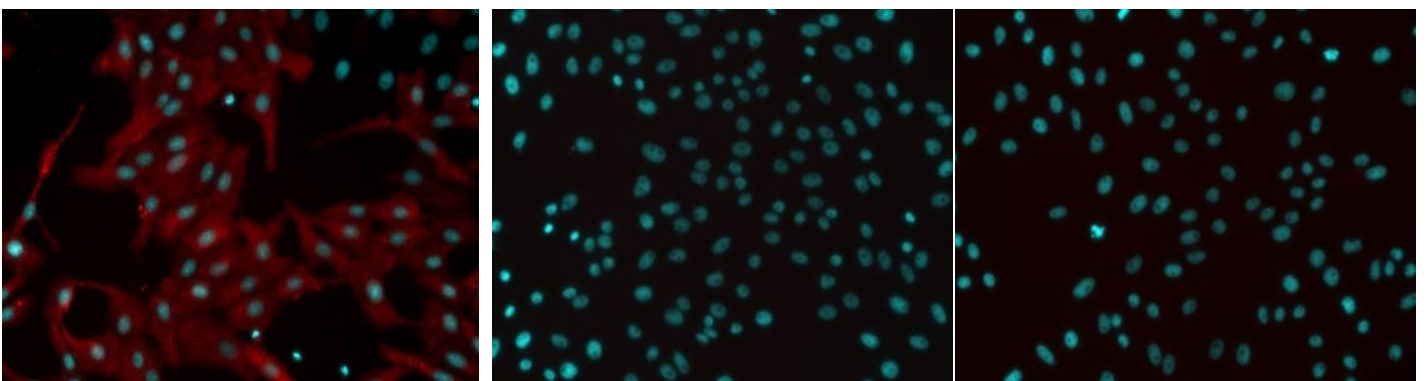
(a) (b) (c)



Fonte: Autoria própria

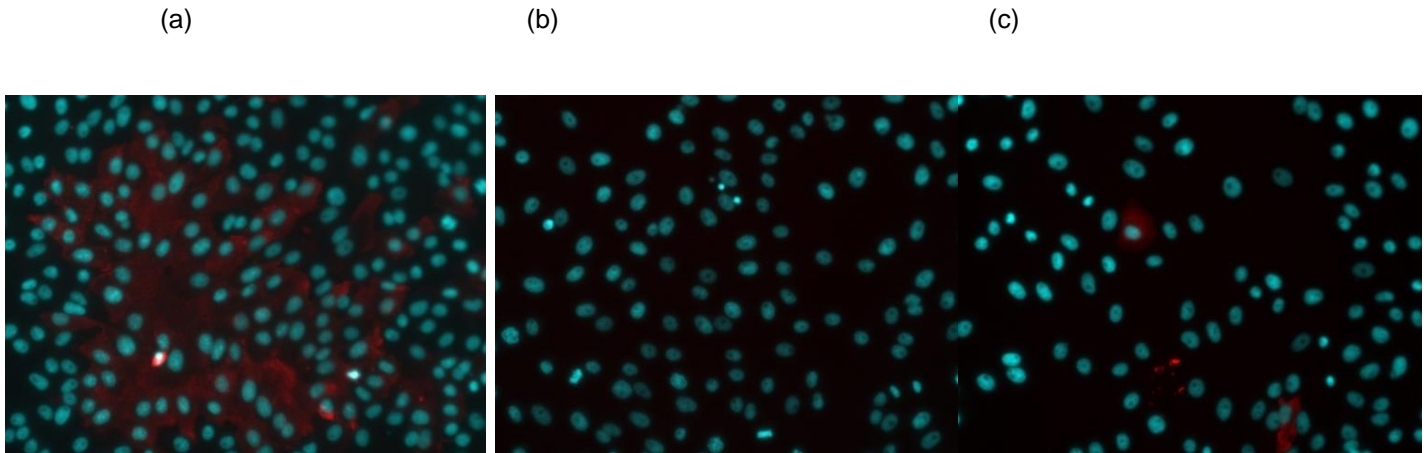
Figura 20: Imunofluorescência das células previamente tratadas com a FAC21 e posteriormente infectadas com OROV. Células foram expostas a FAC21 na concentração 18,5uM e após 1 hora desafiadas com 1,0 MOI de OROV, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC21. Aumento de 20x.

(a) (b) (c)



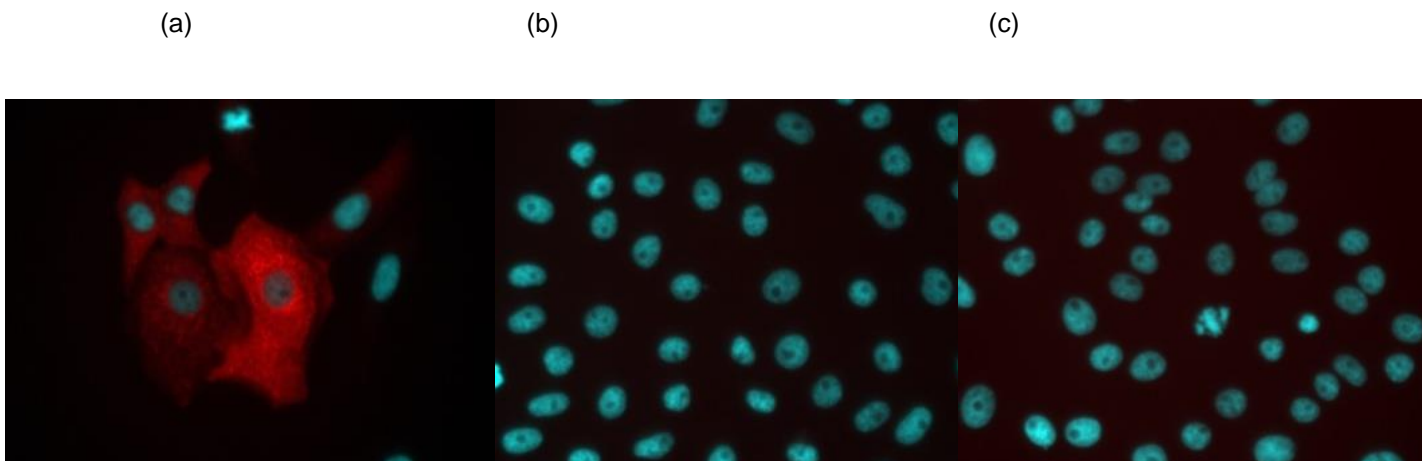
Fonte: Autoria própria

Figura 21: Imunofluorescência das células infectadas com OROV e tratadas com FAC22. Células desafiadas com 1,0 MOI de OROV e tratadas com FAC22 na concentração 18,5uM, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas e tratadas com FAC22. Aumento de 20x.



Fonte: Autoria própria

Figura 22: Imunofluorescência das células infectadas com OROV e tratadas com FAC22. Células desafiadas com 1,0 MOI de OROV previamente exposto por 1h à solução contendo FAC22 na concentração 18,5uM, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC22. Aumento de 40x.



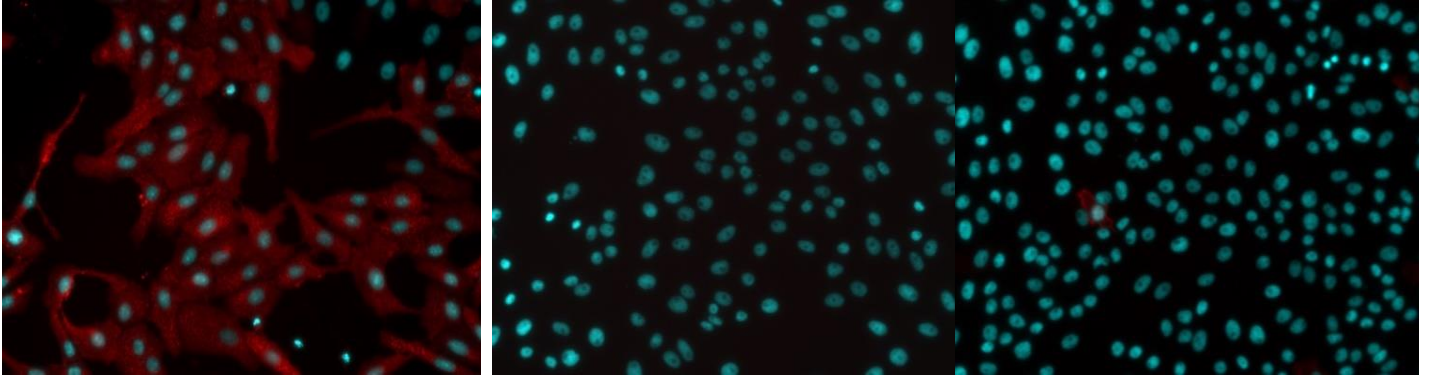
Fonte: Autoria própria

Figura 23: Imunofluorescência das células previamente tratadas com a FAC22 e posteriormente infectadas com OROV. Células foram expostas a FAC22 na concentração 18,5uM e após 1 hora desafiadas com 1,0 MOI de OROV, comprovando a inibição da replicação viral. (a) controle viral (b) controle celular (c) células infectadas com vírus previamente exposto à FAC22. Aumento de 20x.

(a)

(b)

(c)



Fonte: Autoria própria

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos descrevem substâncias naturais e sintéticas como potenciais agentes antivirais contra arbovírus em ensaios *in vitro*. Entretanto, atualmente não existe nenhum fármaco disponível no mercado para o tratamento do vírus Oropouche. Devido a isto, é de suma importância a identificação de novos fármacos que combatam tal patologia. Substâncias naturais e sintéticas derivadas de acridona tem demonstrado ação em múltiplos alvos e apresentam grande potencial no tratamento de diversas doenças (Belmont, Bosson *et al.* 2007, Sepúlveda, Fascio *et al.* 2013).

Neste estudo, avaliamos a potencial atividade antiviral de uma série de acridonas contra o vírus Oropouche com diferentes estratégias metodológicas. Os resultados preliminares demonstraram que quatro compostos tem potencial atividade antiviral.

A avaliação da toxicidade de um composto é indispensável para a avaliação do potencial de ação antiviral em relação às células permissivas aos vírus em estudo (citotoxicidade), pois um agente ideal deve inibir o ciclo replicativo, interferindo minimamente no metabolismo e estrutura do hospedeiro. Sepúlveda e colaboradores (2008) realizaram um estudo sobre a estrutura-atividade de diversos derivados de acridona e observaram atividade antiviral contra o DENV e vírus Junin, causador da febre hemorrágica Argentina. O aumento de atividade ocorreu especialmente onde foram adicionados substituintes halogênicos na estrutura heterocíclica da acridona, mostrando redução da citotoxicidade e incremento no potencial antiviral.

De maneira geral, as acridonas (FACs) selecionadas neste estudo também apresentaram baixa citotoxicidade, com 80% de preservação celular na concentração até 37,5µM para as FACs 02, 04, 05, 17 e 21, 75µM para as FACs 06 e 22, e preservação acima de 80%, em todas as concentrações testadas, para a FAC 07. No caso da FAC16, embora tenha apresentado toxicidade em todas as concentrações pelo ensaio colorimétrico foi possível detectar visualmente que havia atividade celular, por isso os ensaios antivirais foram realizados e observou-se que a

mesma inibia a replicação viral e a monocamada celular permanecia viável. Uma possível explicação é a interferencia do sal MTT com a acridona em questão.

A avaliação da atividade antiviral dos compostos foi realizada pela técnica de placas de lise, onde era analisada a redução do número de placas na monocamada celular em vários pontos da replicação viral. Em se tratando do ensaio pós-infecção, onde as células foram infectadas e posteriormente tratadas com os compostos, os resultados mostraram inibição total da replicação viral para as FACs20 e 22, não havendo formação de placas. Em relação a FAC21, a redução foi de 90%, enquanto a FAC16 reduziu 75% a formação de placas.

É provavel que as propriedades de baixa toxicidade e elevada atividade antiviral das FACs estejam relacionadas com as propriedades estruturais das moléculas, porém, diferente das modificações realizadas pelos autores, às FACs foram adicionados átomos de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio para modificação da estrutura básica da acridona, mostrando assim, que a estrutura básica desta molécula natural é passível de variadas modificações, o que a torna uma importante fonte para pesquisa de novos fármacos.

Variados membros da familia Flaviviridae, como vírus da diarreia viral bovina (Tabarrini, Manfroni *et al.* 2006) e o vírus da hepatite C (Manfroni, Paeshuyse *et al.* 2009) são inibidos por diferentes derivados de acridona, em ambos os estudos os autores apontaram que os compostos interferiram na replicação do RNA viral. Os derivados acridona-4-carboxamidas N-substituídas mostraram inibição das enzimas RNA polimeras e RNA helicase no vírus da hepatite C, havendo intercalação na fita de RNA e, supostamente, paralização da interação entre as enzimas e o ácido nucleico (Stankiewicz-Drogoń, Dörner *et al.* 2010). Em nosso estudo não foi possível realizar o ensaio de intercalação, entretanto, o modo de ação das FACs pode estar relacionado a este mesmo processo.

Mazzucco e colaboradores (2015) demonstraram a atividade do derivado de acridona na inibição dos quatro sorotipos de DENV em célula Vero, sem que houvesse ação direta sobre a célula ou o vírus, mas sim, agindo na replicação intracelular. Segundo os autores, a atividade antiviral da acridona 3d parece interferir

na enzima celular Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH). Ensaio por RT-PCR demonstrou que a atividade antiviral está relacionada à síntese de RNA viral, todavia, o mecanismo pelo qual isso ocorre não foi inteiramente demonstrado. Neste mesmo estudo, a guanosina, um agente que reverte a intercalção da acridona com o material genético, quando adicionada juntamente com o composto estudado reverte à ação antiviral do mesmo, sugerindo um provável envolvimento da IMPDH, enzima chave na biossíntese de nucleotídeos de purina, como local de ação desta molécula. A intercalção de material genético causado pelas Acridonas já está bem esclarecido dentro da literatura, esta é uma hipótese que será futuramente investigada neste estudo.

Na avaliação da inibição da replicação viral pelo ensaio virucida, onde o vírus permanece em contato com os compostos por uma hora, a FAC20 inibiu completamente a formação de placas, já as FAC16 e FAC21 inibiram 85% e a FAC22 mostrou redução de 90% da replicação viral, neste caso, a ação do composto provavelmente se deu diretamente sobre as partículas virais.

A fim de corroborar com os ensaios de placas, foi realizada imunofluorescência indireta. Para tanto, monocamadas celulares foram infectadas e posteriormente tratadas com as FACs, expondo-se o vírus à suspensão contendo os compostos e posterior infecção das células e também como pré-tratamento adicionando a suspensão às células, deixando agir por uma hora, retirando e realizando a infecção posteriormente. Em todas as modalidades de ensaio foi observado que o OROV é sensível à ação das FACs, já que não foi observado fluorescência nas amostras tratadas, indicando que não houve replicação viral.

Além da possível ação sobre as partícula virais, observado no ensaio virucida, nos protocolos onde se utilizou os compostos como tratamento e pré tratamento a ação provavelmente tenha ocorrido dentro da célula, limitando a replicação do vírus no espaço intracelular já que no tratamento a adição da FAC ocorre uma hora após a infecção, neste tempo o vírus provavelmente já tenha penetrado ao interior da célula, no pré-tratamento o composto é adicionado e deixado por uma hora, tempo para que o mesmo penetre na célula que será infectada após a retirada do mesmo.

A Febre do Oropouche é uma das infecções arbovirais mais frequentes no Brasil, sendo apontada com candidata a uma epidemia nas Américas. A ausência de medicamentos para tratar de forma efetiva a doença ou de vacinas como forma de prevenção, indica a necessidade urgente de pesquisa de compostos que cumpram tal função. Neste sentido, nosso trabalho demonstrou que os derivados de acridona FACs16, 20, 21 e 22 apresentaram resultados promissores na inibição da replicação do OROV, entretanto, a pesquisa foi seriamente afetada pela pandemia de SARS-CoV-2, com a interrupção do projeto durante um ano diversos estudos deixaram de ser realizados.

Com isso não foi possível realizar os ensaios com guanosina, onde pretendíamos verificar a reversão da ligação dos compostos com o RNA viral, RT-PCR para avaliarmos a replicação do RNA viral e também ensaios de dose dependência onde avaliaríamos se a concentração das FACs interfere na ação antiviral, dessa forma não foi possível confirmar como ocorre a ação antiviral contra o OROV, estudos adicionais são necessários para elucidar o modo de ação dos compostos e pesquisas in vivo para avaliar padrões como segurança e eficácia, necessários na elaboração de novos fármacos. Estes estudos serão realizados posteriormente para melhor compreensão da atividade antiviral destes derivados de acridona.

6. CONCLUSÃO

As moléculas estudadas são promissoras na inibição da replicação do OROV in vitro e novos estudos serão realizados para confirmar sua eficácia, e para melhor compreensão do seu modo de ação.

REFERÊNCIAS

Acrani, G. O., R. Gomes, J. L. Proença-Módena, A. F. da Silva, P. O. Carminati, M. L. Silva, R. I. Santos and E. Arruda (2010). "Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression." Virus Res **149**(1): 56-63.

Acrani, G. O., N. L. Tilston-Lunel, M. Spiegel, M. Weidmann, M. Dilcher, D. E. Andrade da Silva, M. R. T. Nunes and R. M. Elliott (2015). "Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously." J Gen Virol **96**(Pt 3): 513-523.

Alencar, J., J. B. Pacheco, F. F. Correa, J. o. S. Silva and A. Guimarães (2011). "New report on the bionomics of *Coquillettidia venezuelensis* in temporary breeding sites (Diptera: Culicidae)." Rev Soc Bras Med Trop **44**(2): 247-248.

Ambiente, M. d. M., S. F. Brasileiro, 2010. "Florestas do Brasil." http://www.ciflorestas.com.br/arquivos/doc_florestas_resumo_22648.pdf.

Araújo, R., L. B. Dias, M. T. Araújo, F. Pinheiro and O. F. Oliva (1978). "[Ultrastructural changes in the hamster liver after experimental inoculation with Oropouche arbovirus (type BeAn 19991)]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **20**(1): 45-54.

Artsob, H., R. Lindsay and M. Drebot (2017). Arboviruses. International Encyclopedia of Public Health: 219-226.

Aybar, C. A., M. J. Juri, M. S. De Grosso and G. R. Spinelli (2010). "Species diversity and seasonal abundance of *Culicoides* biting midges in northwestern Argentina." Med Vet Entomol **24**(1): 95-98.

Azevedo, R. S., M. R. Nunes, J. O. Chiang, G. Bensabath, H. B. Vasconcelos, A. Y. Pinto, L. C. Martins, H. A. Monteiro, S. G. Rodrigues and P. F. Vasconcelos (2007). "Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil." Emerg Infect Dis **13**(6): 912-915.

Barbosa, N. S., L. R. Mendonça, M. V. S. Dias, M. C. Pontelli, E. Z. M. da Silva, M. F. Criado, M. E. da Silva-Januário, M. Schindler, M. C. Jamur, C. Oliver, E. Arruda and L. L. P. daSilva (2018). "ESCRT machinery components are required for Orthobunyavirus particle production in Golgi compartments." PLoS Pathog **14**(5): e1007047.

Barr, J. N., R. M. Elliott, E. F. Dunn and G. W. Wertz (2003). "Segment-specific terminal sequences of Bunyamwera bunyavirus regulate genome replication." Virology **311**(2): 326-338.

Bastos, M. e. S., L. T. Figueiredo, F. G. Naveca, R. L. Monte, N. Lessa, R. M. Pinto de Figueiredo, J. B. Gimaque, G. Pivoto João, R. Ramasawmy and M. P. Mourão (2012). "Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil." Am J Trop Med Hyg **86**(4): 732-735.

Batista, P. M., R. Andreotti, P. S. Almeida, A. C. Marques, S. G. Rodrigues, J. O. Chiang and P. F. Vasconcelos (2013). "Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **46**(6): 684-690.

Batista, P. M., R. Andreotti, J. O. Chiang, M. S. Ferreira and P. F. Vasconcelos (2012). "Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **45**(2): 168-173.

Belmont, P., J. Bosson, T. Godet and M. Tiano (2007). "Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now?" Anticancer Agents Med Chem **7**(2): 139-169.

Bowden, T. A., D. Bitto, A. McLees, C. Yeromonahos, R. M. Elliott and J. T. Huiskonen (2013). "Orthobunyavirus ultrastructure and the curious tripodal glycoprotein spike." PLoS Pathog **9**(5): e1003374.

Bridgen, A., F. Weber, J. K. Fazakerley and R. M. Elliott (2001). "Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 664-669.

Butler, M. S. (2008). "Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials." Nat Prod Rep **25**(3): 475-516.

Calisher, C. H. (2005). "A very brief history of arbovirology, focusing on contributions by workers of the Rockefeller foundation." Vector Borne Zoonotic Dis **5**(2): 202-211.

Cardoso, B. F., O. P. Serra, L. B. Heinen, N. Zuchi, V. C. Souza, F. G. Naveca, M. A. Santos and R. D. Silhessarenko (2015). "Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **110**(6): 745-754.

Cardoso, J. a. C., M. A. de Almeida, E. dos Santos, D. F. da Fonseca, M. A. Sallum, C. A. Noll, H. A. Monteiro, A. C. Cruz, V. L. Carvalho, E. V. Pinto, F. C. Castro, J. P. Nunes Neto, M. N. Segura and P. F. Vasconcelos (2010). "Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, southern Brazil, 2008." Emerg Infect Dis **16**(12): 1918-1924.

Carpenter, S., M. H. Groschup, C. Garros, M. L. Felipe-Bauer and B. V. Purse (2013). "Culicoides biting midges, arboviruses and public health in Europe." Antiviral Res **100**(1): 102-113.

Cleton, N., M. Koopmans, J. Reimerink, G. J. Godeke and C. Reusken (2012). "Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers." J Clin Virol **55**(3): 191-203.

Culquichicón, C., J. A. Cardona-Ospina, A. M. Patiño-Barbosa and A. J. Rodríguez-Morales (2017). "Bibliometric analysis of Oropouche research: impact on the surveillance of emerging arboviruses in Latin America." F1000Res **6**: 194.

de Souza Luna, L. K., A. H. Rodrigues, R. I. Santos, R. Sesti-Costa, M. F. Criado, R. B. Martins, M. L. Silva, L. S. Delcaro, J. L. Proença-Modena, L. T. Figueiredo, G. O. Acrani and E. Arruda (2017). "Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients." J Med Virol **89**(6): 1108-1111.

Dev, S. (2010). "Impact of natural products in modern drug development." Indian J Exp Biol **48**(3): 191-198.

Diniz, J. A., M. R. Nunes, A. P. Travassos da Rosa, A. C. Cruz, W. de Souza, D. B. Medeiros, J. O. Chiang and P. F. Vasconcelos (2006). "Characterization of two new rhabdoviruses isolated from midges (*Culicoides* spp) in the Brazilian Amazon: proposed members of a new genus, *Bracorhabdovirus*." Arch Virol **151**(12): 2519-2527.

Elliott, R. M. (2014). "Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights." Nat Rev Microbiol **12**(10): 673-685.

FIELDS, B. N. (1998). Fundamental Virology. Philadelphia, Lippincott-Raven Press.

Figueiredo, L. T. (2007). "Emergent arboviruses in Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **40**(2): 224-229.

Figueiredo, L. T. (2015). "The recent arbovirus disease epidemic in Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **48**(3): 233-234.

FONSECA, B. and L. FIGUEIREDO (2002.). Febre Amarela. VERONESI: Tratado de Infectologia. São Paulo, Atheneu.

Fontana, J., N. López-Montero, R. M. Elliott, J. J. Fernández and C. Risco (2008). "The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex." Cell Microbiol **10**(10): 2012-2028.

Fragkoudis, R., G. Attarzadeh-Yazdi, A. A. Nash, J. K. Fazakerley and A. Kohl (2009). "Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection." J Gen Virol **90**(Pt 9): 2061-2072.

Fujiwara, M., M. Okamoto, M. Watanabe, H. Machida, S. Shigeta, K. Konno, T. Yokota and M. Baba (1999). "Acridone derivatives are selective inhibitors of HIV-1 replication in chronically infected cells." Antiviral Res **43**(3): 189-199.

Galdino-Pitta, M. R., M. G. Pitta, M. C. Lima, L. S. Galdino and R. I. Pitta (2013). "Niche for acridine derivatives in anticancer therapy." Mini Rev Med Chem **13**(9): 1256-1271.

Ganesan, A. (2008). "The impact of natural products upon modern drug discovery." Curr Opin Chem Biol **12**(3): 306-317.

Gibrail, M. M., F. S. Fiaccadori, M. Souza, T. N. Almeida, J. O. Chiang, L. C. Martins, M. S. Ferreira and D. Cardoso (2016). "Detection of antibodies to Oropouche virus in non-human primates in Goiânia City, Goiás." Rev Soc Bras Med Trop **49**(3): 357-360.

Gubler, D. J. (1996). "The global resurgence of arboviral diseases." Trans R Soc Trop Med Hyg **90**(5): 449-451.

Gubler, D. J. (2001). "Human arbovirus infections worldwide." Ann N Y Acad Sci **951**: 13-24.

Guo, X. X., C. X. Li, Y. Q. Deng, D. Xing, Q. M. Liu, Q. Wu, A. J. Sun, Y. D. Dong, W. C. Cao, C. F. Qin and T. Y. Zhao (2016). "Culex pipiens quinquefasciatus: a potential vector to transmit Zika virus." Emerg Microbes Infect **5**(9): e102.

Guth, S., K. A. Hanley, B. M. Althouse and M. Boots (2020). "Ecological processes underlying the emergence of novel enzootic cycles: Arboviruses in the neotropics as a case study." PLoS Negl Trop Dis **14**(8): e0008338.

Gutierrez, B., E. L. Wise, S. T. Pullan, C. H. Logue, T. A. Bowden, M. Escalera-Zamudio, G. Trueba, M. R. T. Nunes, N. R. Faria and O. G. Pybus (2020). "Evolutionary Dynamics of Oropouche Virus in South America." J Virol **94**(5).

Hang, J., B. M. Forshey, T. J. Kochel, T. Li, V. F. Solórzano, E. S. Halsey and R. A. Kuschner (2012). "Random amplification and pyrosequencing for identification of novel viral genome sequences." J Biomol Tech **23**(1): 4-10.

Humphreys, J. G. and E. C. Turner (1973). "Blood-feeding activity of female Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae)." J Med Entomol **10**(1): 79-83.

Jones, K. E., N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman and P. Daszak (2008). "Global trends in emerging infectious diseases." Nature **451**(7181): 990-993.

Kaur, J. and P. Singh (2011). "Acridine derivatives: a patent review (2009 - 2010)." Expert Opin Ther Pat **21**(4): 437-454.

Lappin, D. F., G. W. Nakitare, J. W. Palfreyman and R. M. Elliott (1994). "Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm." J Gen Virol **75 (Pt 12)**: 3441-3451.

Lennette, D. A. (1995). General principles for Laboratory Diagnosis of Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. E. H. Lennette, D. A. Lennette and E. T. Lennette. Washington, American Public Health Association.

Linley, J. R., A. L. Hoch and F. P. Pinheiro (1983). "Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health." J Med Entomol **20**(4): 347-364.

Livonesi, M. C., R. L. De Sousa, S. J. Badra and L. T. Figueiredo (2006). "In vitro and in vivo studies of ribavirin action on Brazilian Orthobunyavirus." Am J Trop Med Hyg **75**(5): 1011-1016.

Livonesi, M. C., R. L. de Sousa, S. J. Badra and L. T. Figueiredo (2007). "In vitro and in vivo studies of the Interferon-alpha action on distinct Orthobunyavirus." Antiviral Res **75**(2): 121-128.

M., R. M., S. G. R., L. Irene and D. Florentina (2003). LA IMPORTANCIA SANITARIA DE LOS JEJENES DEL GÉNERO

Culicoides (DÍPTERA: CERATOPOGONIDAE) EN LA ARGENTINA. Entomol. Vect: 601-612.

Manfroni, G., J. Paeshuyse, S. Massari, S. Zanolli, B. Gatto, G. Maga, O. Tabarrini, V. Cecchetti, A. Fravolini and J. Neyts (2009). "Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replication by acridone derivatives: identification of an NS3 helicase inhibitor." J Med Chem **52**(10): 3354-3365.

Marklewitz, M. and S. Junglen (2019). "Evolutionary and ecological insights into the emergence of arthropod-borne viruses." Acta Trop **190**: 52-58.

Mazzucco, M. B., L. B. Talarico, S. Vatansever, A. C. Carro, M. L. Fascio, N. B. D'Accorso, C. C. García and E. B. Damonte (2015). "Antiviral activity of an N-allyl acridone against dengue virus." J Biomed Sci **22**: 29.

McDonald, S. M., M. I. Nelson, P. E. Turner and J. T. Patton (2016). "Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes." Nat Rev Microbiol **14**(7): 448-460.

Mellor, P. S., J. Boorman and M. Baylis (2000). "Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors." Annu Rev Entomol **45**: 307-340.

Moreli, M. L., V. H. Aquino, A. C. Cruz and L. T. Figueiredo (2002). "Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR." J Med Virol **66**(1): 139-142.

Mota, M. T., A. C. Terzian, M. L. Silva, C. Estofolete and M. L. Nogueira (2016). "Mosquito-transmitted viruses - the great Brazilian challenge." Braz J Microbiol **47 Suppl 1**: 38-50.

Mourão, M. P., M. e. S. Bastos, R. M. Figueiredo, J. B. Gimaque, V. o. C. Alves, M. Saraiva, M. L. Figueiredo, R. Ramasawmy, M. L. Nogueira and L. T. Figueiredo (2015). "Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas." Rev Soc Bras Med Trop **48 Suppl 1**: 20-26.

Mourão, M. P., M. S. Bastos, J. B. Gimaqu, B. R. Mota, G. S. Souza, G. H. Grimmer, E. S. Galusso, E. Arruda and L. T. Figueiredo (2009). "Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008." Emerg Infect Dis **15**(12): 2063-2064.

Navarro, J. C., D. Giambalvo, R. Hernandez, A. J. Auguste, R. B. Tesh, S. C. Weaver, H. Montañez, J. Liria, A. Lima, J. F. Travassos da Rosa, S. P. da Silva, J. M. Vasconcelos, R. Oliveira, J. L. Vianez and M. R. Nunes (2016). "Isolation of Madre de Dios Virus (Orthobunyavirus; Bunyaviridae), an Oropouche Virus Species Reassortant, from a Monkey in Venezuela." Am J Trop Med Hyg **95**(2): 328-338.

Naveca, F. G., V. A. D. Nascimento, V. C. Souza, B. T. D. Nunes, D. S. G. Rodrigues and P. F. D. C. Vasconcelos (2017). "Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses." Mem Inst Oswaldo Cruz **112**(7): 510-513.

Nunes, M. R., L. C. Martins, S. G. Rodrigues, J. O. Chiang, R. o. S. Azevedo, A. P. da Rosa and P. F. Vasconcelos (2005). "Oropouche virus isolation, southeast Brazil." Emerg Infect Dis **11**(10): 1610-1613.

Oliveira, A. S. d. (2017). Estudo da apoptose induzida pela proteína NSs do vírus Oropouche Doctoral, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

PINHEIRO, F. d. P. e. a. (1962). Epidemia de vírus Oropouche em Belém. Revista de Servico Especial de Saude Publica. **12**: 15-23.

Pinheiro, F. P., A. G. Rocha, R. B. Freitas, B. A. Ohana, A. P. Travassos da Rosa, J. S. Rogério and A. C. Linhares (1982). "[Meningitis associated with Oropouche virus infections]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **24**(4): 246-251.

Pinheiro, F. P., A. P. Travassos da Rosa, M. L. Gomes, J. W. LeDuc and A. L. Hoch (1982). "Transmission of Oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*." Science **215**(4537): 1251-1253.

Pinheiro, F. P., A. P. Travassos da Rosa, J. F. Travassos da Rosa and G. Bensabath (1976). "An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of santarem, para, barzil." Tropenmed Parasitol **27**(2): 213-223.

Pinheiro, F. P., A. P. Travassos da Rosa, J. F. Travassos da Rosa, R. Ishak, R. B. Freitas, M. L. Gomes, J. W. LeDuc and O. F. Oliva (1981). "Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings." Am J Trop Med Hyg **30**(1): 149-160.

Pulzova, L., M. R. Bhide and K. Andrej (2009). "Pathogen translocation across the blood-brain barrier." FEMS Immunol Med Microbiol **57**(3): 203-213.

Rishton, G. M. (2008). "Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues." Am J Cardiol **101**(10A): 43D-49D.

Rodrigues, A. H., R. I. Santos, G. M. Arisi, E. S. Bernardes, M. L. Silva, M. A. Rossi, M. B. Lopes and E. Arruda (2011). "Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*)." Virus Res **155**(1): 35-41.

Rodriguez-Morales, A. J., A. E. Paniz-Mondolfi, W. E. Villamil-Gomez and J. C. Navarro (2016). "Mayaro, Oropouche and Venezuelan Equine Encephalitis viruses: Following in the footsteps of Zika?" Travel Med Infect Dis.

Romero-Alvarez, D. and L. E. Escobar (2017). "Vegetation loss and the 2016 Oropouche fever outbreak in Peru." Mem Inst Oswaldo Cruz **112**(4): 292-298.

Romero-Alvarez, D. and L. E. Escobar (2018). "Oropouche fever, an emergent disease from the Americas." Microbes Infect **20**(3): 135-146.

Saeed, M. F., M. Nunes, P. F. Vasconcelos, A. P. Travassos Da Rosa, D. M. Watts, K. Russell, R. E. Shope, R. B. Tesh and A. D. Barrett (2001). "Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay." J Clin Microbiol **39**(7): 2445-2452.

Sakkas, H., P. Bozidis, A. Franks and C. Papadopoulou (2018). "Oropouche Fever: A Review." Viruses **10**(4).

Santos, R. I., A. H. Rodrigues, M. L. Silva, R. A. Mortara, M. A. Rossi, M. C. Jamur, C. Oliver and E. Arruda (2008). "Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification." Virus Res **138**(1-2): 139-143.

Saúde, S. d. V. e. (2003). "Primeiro inquérito sorológico em aves migratórias e nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus do Nilo Ocidental.", <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/17/Ano03-n01-1---inq-sorol-aves-virus-fno-rs.pdf>.

Saúde, S. M. d., D. d. V. e. Saúde and C. d. I. E. e. V. à. S.-P. M. d. Salvador. (2017). "Informe para situação epidemiológica da febre do oropouche em salvador-ba." <http://www.cievs.saude.salvador.ba.gov.br/informe-para-situacaoepidemiologica-da-febre-do-oropouche-em-salvador-ba/>.

Sepúlveda, C. S., M. L. Fascio, C. C. García, N. B. D'Accorso and E. B. Damonte (2013). "Acridones as antiviral agents: synthesis, chemical and biological properties." Curr Med Chem **20**(19): 2402-2414.

Sepúlveda, C. S., M. L. Fascio, M. B. Mazzucco, M. L. Palacios, R. F. Pellón, C. C. García, N. B. D'Accorso and E. B. Damonte (2008). "Synthesis and evaluation of N-substituted acridones as antiviral agents against haemorrhagic fever viruses." Antivir Chem Chemother **19**(1): 41-47.

Singh, S. B. and J. F. Barrett (2006). "Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products." Biochem Pharmacol **71**(7): 1006-1015.

Smith, G. C. and D. B. Francly (1991). "Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses." J Am Mosq Control Assoc **7**(1): 89-93.

Stankiewicz-Drogoń, A., B. Dörner, T. Erker and A. M. Boguszewska-Chachulska (2010). "Synthesis of new acridone derivatives, inhibitors of NS3 helicase, which efficiently and specifically inhibit subgenomic HCV replication." J Med Chem **53**(8): 3117-3126.

Tabarrini, O., G. Manfroni, A. Fravolini, V. Cecchetti, S. Sabatini, E. De Clercq, J. Rozenski, B. Canard, H. Dutartre, J. Paeshuyse and J. Neyts (2006). "Synthesis and anti-BVDV activity of acridones as new potential antiviral agents." J Med Chem **49**(8): 2621-2627.

Teresina, F.-F. M. d. S.-P. M. d. (2021). "FMS Teresina recebe exames indicativos de infecção pelo vírus Oropouche." 2021, <https://fms.pmt.pi.gov.br/noticia/3910/fms-teresina-recebe-exames-indicativos-de-infeccao-pelo-virus-oropouche>.

Tesh, R. B. (1994). "The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America." Ann N Y Acad Sci **740**: 129-137.

Tilston-Lunel, N. L., G. O. Acrani, R. E. Randall and R. M. Elliott (2015). "Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs." J Virol **90**(5): 2616-2627.

Tilston-Lunel, N. L., J. Hughes, G. O. Acrani, D. E. da Silva, R. S. Azevedo, S. G. Rodrigues, P. F. Vasconcelos, M. R. Nunes and R. M. Elliott (2015). "Genetic analysis of members of the species Oropouche virus and identification of a novel M segment sequence." J Gen Virol **96**(Pt 7): 1636-1650.

Travassos da Rosa, J. F., W. M. de Souza, F. P. Pinheiro, M. L. Figueiredo, J. F. Cardoso, G. O. Acrani and M. R. T. Nunes (2017). "Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus." Am J Trop Med Hyg **96**(5): 1019-1030.

Turpin, J. A., R. W. Buckheit, D. Derse, M. Hollingshead, K. Williamson, C. Palamone, M. C. Osterling, S. A. Hill, L. Graham, C. A. Schaeffer, M. Bu, M. Huang, W. M. Cholody, C. J. Michejda and W. G. Rice (1998). "Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription." Antimicrob Agents Chemother **42**(3): 487-494.

Vasconcelos, P. F., J. F. Travassos Da Rosa, S. C. Guerreiro, N. Dégallier, E. S. Travassos Da Rosa and A. P. Travassos Da Rosa (1989). "[1st register of an epidemic caused by Oropouche virus in the states of Maranhão and Goiás, Brazil]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **31**(4): 271-278.

Vasconcelos, P. F. C., A. P. A. Travassos da Rosa, F. P. PINHEIRO and J. F. S. Travassos da Rosa (2005). Arboviroses. VERONESI: Tratado de Infectologia. São Paulo, Atheneu: 289-302.

Vernal, S., C. C. R. Martini and B. A. L. da Fonseca (2019). "Oropouche Virus-Associated Aseptic Meningoencephalitis, Southeastern Brazil." Emerg Infect Dis **25**(2): 380-382.

ICTV (2020). Retrieved 07/09/2020, https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201900124.

Weaver, S. C. (2013). "Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention." Trends Microbiol **21**(8): 360-363.

Wirth, W. W. and M. L. Felipe-Bauer (1989). "The neotropical biting midges related to *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae)." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **84**.

Wise, E. L., S. Márquez, J. Mellors, V. Paz, B. Atkinson, B. Gutierrez, S. Zapata, J. Coloma, O. G. Pybus, S. K. Jackson, G. Trueba, G. Fejer, C. H. Logue and S. T. Pullan (2020). "Oropouche virus cases identified in Ecuador using an optimised qRT-PCR informed by metagenomic sequencing." PLoS Negl Trop Dis **14**(1): e0007897.

Wise, E. L., S. T. Pullan, S. Márquez, V. Paz, J. D. Mosquera, S. Zapata, S. K. Jackson, G. Fejer, G. Trueba and C. H. Logue (2018). "Isolation of Oropouche Virus from Febrile Patient, Ecuador." Emerg Infect Dis **24**(5): 935-937.

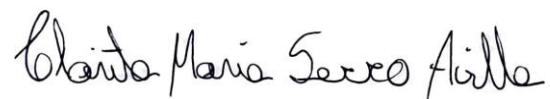
Yamamoto, N., H. Furukawa, Y. Ito, S. Yoshida, K. Maeno and Y. Nishiyama (1989). "Anti-herpesvirus activity of citrussinine-I, a new acridone alkaloid, and related compounds." Antiviral Res **12**(1): 21-36.

Zhang, B., X. Li, B. Li, C. Gao and Y. Jiang (2014). "Acridine and its derivatives: a patent review (2009 - 2013)." Expert Opin Ther Pat **24**(6): 647-664.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 02/08/2021



Assinatura do autor