

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/04/2022.



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

Daniel Oliveira Silva Martins

Atividade antiviral de Tiossemicarbazona conjugada com complexo metálico de Cobalto (III)  
contra o vírus Chikungunya *in vitro*.

São José do Rio Preto

2020

Daniel Oliveira Silva Martins

Atividade antiviral de Tiossemicarbazona conjugada com complexo metálico de Cobalto (III) contra o vírus Chikungunya *in vitro*.

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 Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

**Financiadora:** CAPES/DS 001

FAPEMIG - Processo APQ-03385-18

CNPQ - Processo445021/2014-4

**Orientadora:** Profa.Dra. Ana Carolina Gomes Jardim

São José do Rio Preto

2020

M386a

Martins, Daniel Oliveira Silva

Atividade antiviral de Tiossemicarbazona conjugada com complexo metálico de Cobalto (III) contra o vírus Chikungunya in vitro. / Daniel Oliveira Silva Martins.  
-- São José do Rio Preto, 2020

120 f. : il., tabs.

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

Orientadora: Ana Carolina Gomes Jardim

1. Virologia. 2. Arbovirose. 3. Chikungunya. 4. Antiviral. 5.

Tiossemicarbazona. 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.

Daniel Oliveira Silva Martins

Atividade antiviral de Tiossemicarbazona conjugada com complexo metálico de Cobalto (III) contra o vírus Chikungunya *in vitro*.

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 Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

**Bolsa:** CAPES/DS 001

**Financiadora:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG – Processo APQ-03385-18

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ 445021/2014-4

Comissão Examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ana Carolina Gomes Jardim

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia

Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Carolina Colombelli Pacca

Instituição: Instituto de Educação Superior Ceres (UNICERES)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Fernanda de Freitas Anibal

Instituição: Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

Uberlândia

30 Abril de 2020

## ***Agradecimentos***

*Primeiramente agradeço a Deus e minha família, em especial minha vó, minha mãe, minha irmã Danielle e meu pai, vocês são meu pilar e minha fortaleza desde o dia que nasci.*

*Agradeço a minha orientadora, Carol Jardim, que vem me ensinando ciência desde meu período da graduação, quando iniciei meu primeiro projeto científico. Agradeço por ser uma orientadora profissional e amiga.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – processo APQ-03385-18 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPQ) - processo 445021/2014-4. Agradeço ao programa de pós-graduação em Microbiologia do IBILCE (UNESP) e todos seus funcionários que em momentos oportunos me deram apoio e executaram suas respectivas tarefas com maestria.*

*Agradeço aos meus colegas de graduação que também muito me apoiaram, de várias formas, para a conclusão deste trabalho, em especial Isadora, Karen, Marília, Danillo, Youry e Ana Luiza, cada um de vocês teve uma contribuição particular neste trabalho.*

*Agradeço as minhas parceiras de mestrado que tornaram meu tempo em São José do Rio Preto mais leve e carinhoso são elas, Juliana, Jacqueline e Tamara, vocês foram luz no fim do túnel de muitos dias tristes e desanimadores.*

*Agradeço ao meu namorado por me ouvir, me acompanhar no laboratório nos finais de semana, algumas madrugadas e por me dar apoio emocional essencial para esse período.*

*Agradeço as técnicas de laboratório Thelma Mattos e Ana Claudia que me facilitaram muitos caminhos para acesso à equipamentos e solução de algumas burocracias.*

*Agradeço as professoras do Instituto de Química da UFU, Amanda Duanello e Carolina Gonçalves pela parceria e confiança. Agradeço ao professor Carlos Martins do Instituto de Ciências Biomédicas, professor Nilson Nicolau e professora Ana Graci do Instituto de Biotecnologia da UFU.*

*Por último, agradeço a excepcional equipe do laboratório de Virologia, Igor, Giulia, Amanda, Débora, Jacqueline, Suely, Victória, Jhenyfer, Marina e Shiraz. Vocês são pessoas muito especiais as quais desenvolvi um carinho muito grande e que carregarei várias lembranças por toda minha vida.*

## Resumo

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um vírus de RNA de fita simples e polaridade positiva da família *Togoviridae* que é transmitido pela picada da fêmea do mosquito *Aedes sp.* Os pacientes infectados com CHIKV são afetados pela doença febril Chikungunya, que apresenta febre e dores nas articulações como sintomas clínicos. Além disso, os pacientes podem desenvolver uma doença crônica que pode levar a incapacidade. Atualmente, não há tratamento antiviral contra o CHIKV, demonstrando a necessidade de desenvolvimento e pesquisa de novos agentes antivirais. Nesse contexto, alguns estudos têm demonstrado que as tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos possuem propriedades farmacológicas como atividade antitumoral, antiparasitária, antibacteriana e antiviral. A síntese desses compostos é simples, limpa, versátil e tem alto rendimento. Apesar disso não há atividade anti-CHIKV descrita, na literatura disponível, destes compostos contra CHIKV. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiviral de tiossemicarbazona conjugada com Cobalto (III) (CoAtc-Ph) e seus precursores metálicos contra o CHIKV *in vitro*. Para isso, células BHK 21 foram infectadas com CHIKV *nanoluciferase* (M.O.I 0,01) na presença ou ausência de cada composto em concentração não citotóxica por 16 horas. Através deste ensaio, CoAtc-Ph a 50  $\mu\text{M}$  inibiu 94% da infecção por CHIKV. Usando uma faixa mais ampla de concentrações, foi determinado que o composto tem um  $\text{EC}_{50}$  de 19,02  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CC}_{50}$  de 62,08  $\mu\text{M}$  e SI de 3,26. Ensaio adicionais demonstraram que o CoAtc-Ph inibiu a pós-entrada do CHIKV nas células hospedeiras. Possíveis mecanismos de ação antiviral foram investigados avaliando-se a intercalação desse composto no dsRNA viral e, sua interação com a proteína não-estrutural 4 de chikungunya (nsP4). CoAtc-Ph mostrou forte interação com nsP4, sugerindo que este composto pode inibir o ciclo de CHIKV através dessa interação. Também análises *in silico* demonstraram que o CoAtc-Ph interage com o nsP4 através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Considerando a interação do CoAtc-Ph com a nsP4 e sua interação através de análises *in silico*, podemos sugerir que este pode ser o mecanismo de ação deste composto.

**Palavras-chave:** Arbovirose. Virus Chikungunya. Antiviral. Tiossemicarbazona. Nsp4.

## Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is a single positive strand RNA virus from the *Togoviridae* family that is transmitted through the bite of the female mosquito *Aedes* sp. CHIKV infected patients are affected by Chikungunya fever disease which presents fever and joint pains as clinical symptoms. Additionally, patients may develop a chronic disease that can lead to a disability. Currently, there is no antiviral treatment against CHIKV, demonstrating the necessity to develop novel antiviral agents. In this context, some studies have shown that thiosemicarbazones and their metal complexes possess pharmacological properties as antitumor, antiprotozoal, antibacterial and antiviral activity. The synthesis of these compounds is simple, clean, versatile and results in high yields. Although there is no anti-CHIKV activity described in the available literature of this compounds against CHIKV. Therefore, this work aimed to evaluate the antiviral activity of Cobalt (III) - conjugated thiosemicarbazone (CoAtc-Ph) and its metal precursors against CHIKV *in vitro*. For this, BHK 21 cells were infected with CHIKV *nanoluciferase* (M.O.I 0.01) in the presence or absence of each compound at non-cytotoxicity concentration for 16 hours. Through this assay, CoAtc-Ph at 50  $\mu\text{M}$  inhibited 94% of CHIKV infection. Using a wider range of concentrations, it was determined that the compound has an  $\text{EC}_{50}$  of 19.02  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CC}_{50}$  of 62.08  $\mu\text{M}$  and SI of 3.26. Additional assays demonstrated that CoAtc-Ph inhibited CHIKV post entry to the host cells. Possible mechanisms of antiviral action were investigated by evaluating the intercalation of this compound into the viral dsRNA and, its interaction with chikungunya non-structural protein 4 (nsP4). CoAtc-Ph did shown strong interaction with nsP4 suggesting that this compound may inhibits CHIKV cycle through this. Also *in silico* analyses demonstrated that CoAtc-Ph intereracted with nsP4 through hydrogen bonds, hydrophobic and electrostatic interactions. Considering the interaction of CoAtc-Ph with nsP4 and its interaction through *in silico* analyses we can suggest that this may be the action mechanism of this compound

**Keywords:** Arboviruses. Chikungunya virus. Antiviral. Thiosemicarbazone. Nsp4



## **Lista de de ilustrações**

<b>Figura 1.</b> Esquema da infecção pelo CHIKV	13
<b>Figura 2.</b> Distribuição mundial do mosquito <i>Aedes albopictus</i>	15
<b>Figura 3.</b> Distribuição mundial do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	15
<b>Figura 4.</b> Organização do Genoma viral do Chikungunya	16
<b>Figura 5.</b> Esquema Representativo do ciclo replicativo de CHIKV	19
<b>Figura 6.</b> Mapa da distribuição mundial do CHIKV	20
<b>Figura 7.</b> Possíveis casos de febre CHIKV no Brasil	21

### **ANEXO A**

<b>Figure 1.</b> Schematic representation of CHIKV replication cycle. Natural compounds with antiviral activity against CHIKV are indicated in each step of virus replication cycle.	60
--	----

### **ANEXO B**

<b>Figure 1.</b> <i>In vitro</i> screening of 12 MCCB compounds selected from docking analyses.	94
<b>Figure 2.</b> Structure of compounds C5, C13 and analogues.	95
<b>Figure 3.</b> Activity of selected compounds and analogues against CHIKV replication.	96
<b>Figure 4.</b> Effect of C13 and C5 at different stages of CHIKV replication.	97
<b>Figure 5.</b> Activity of C5 and C1 in RD and C2C12 cells lines.	98

### **ANEXO C**

<b>Figure 1.</b> Schematic representation of Zika Virus replicative cycle.	101
--	-----

## **Lista de abreviatura**

CC<sub>50</sub> – Concentração citotóxica de 50 %

CDC – *Centers for disease control and prevention* (Centro de controle e prevenção de doenças)

CHIKV – Vírus Chikungunya

CMC – Carboximetilcelulose

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

DENV – Vírus Dengue

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO – Dimetil-sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribunucleico

DOX – Doxorrubicina

dsRNA – *Double-Stranded RNA* (Dupla fita de RNA)

EC<sub>50</sub> – Concentração efetiva de 50%

ECSA – *East-Central-South African* (Leste-Centro-Sul Africano)

EGFP – *Green fluorescence protein* (Proteína de fluorescência verde)

FTIR - *Fourier-transform infrared spectroscopy* (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)

GAG- Glicosaminoglicanos

h.p.i – Hours post infection (horas depois da infecção)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HSV – Herpes vírus

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IOL – *Indian-Ocean* (Oceano-Índico)

kb – kilobase

MAYV – Vírus Mayaro

M.O.I – *Multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]

nsP – *non-structural protein* (proteína não estrutural)

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – *open read frame* (fase de leitura aberta)

PBS – *Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato salino)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação de polimerase em cadeia)

PFU – *Plate forming-unit* (Unidade formadora de palca)

PHB – proibitina

PtdSer- fosfatidilserina

RE – Retículo endoplasmático

Rluc – Renilla luciferase

RNA – Ácido ribonucleico

SI – Índice de seleção

SRV – Vírus do sarcoma de Rous

UTR – *Untranslated region* (região não traduzível)

WA – *West African* (Oeste Africano)

ZIKV – Vírus Zik

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1. Arboviroses.....	11
1.2. Febre Chikungunya .....	11
1.3. Patogênese .....	12
1.4. Diagnóstico.....	14
1.5. O vetor .....	14
1.6. Vírus Chikungunya.....	16
1.7. Ciclo replicativo .....	18
1.8. Epidemiologia.....	19
1.9. Tratamento.....	22
1.10. Atividade biológica de tiossemicarbazonas.....	22
1.11 Objetivo .....	23
1.12 Objetivos específicos.....	23
Referências .....	24
2. Cobalt-conjugated Thiosemicarbazone inhibits chikungunya replication <i>in vitro</i> by interacting with RNA-dependent RNA polymerase (nsP4) .....	33
2.1 Introduction .....	35
2.2 Material and methods .....	37
2.2.1 Compounds .....	37
2.2.2 Cell culture.....	37
2.2.3 Virus.....	37
2.2.4 Cell viability through MTT assay .....	38
2.2.5 Antiviral activity assays.....	38
2.2.6 Intercalation assay.....	39
2.2.7 CHIKV nsP4 cloning, overexpression and purification: .....	39
2.2.8 Microscale Thermophoresis (MTS).....	39
2.2.9 <i>In silico</i> analyses .....	40
2.2.10 Statistical analysis.....	41
2.3 Results .....	41
2.4 Discussion.....	43
References.....	45
APÊNDICE A. Estrutura dos compostos, sequência CHIKV, gráfico de ensaio de viabilidade e infecção geral. ....	49
APÊNDICE B. Gráfico de ensaio de EC <sub>50</sub> e CC <sub>50</sub> . ....	51
APÊNDICE C. Gráfico e esquema do ensaio para testar a atividade do composto em diferentes etapas da infecção viral.....	53
APÊNDICE D. Ensaio de Intercalação de dsRNA.....	55

APÊNDICE E. Purificação e expressão de nsP4 de CHIKV. Interação biofísica e in silico de nsP4 com tiossemicarbazona conjugada com Co(III) .....	57
ANEXO A: REVIEW ARTICLE ANTIVIRALS AGAINST CHIKUNGUNYA VIRUS: IS THE SOLUTION IN NATURE?.....	59
ANEXO B: IS THE ADP RIBOSE SITE OF THE CHIKUNGUNYA VIRUS NSP3 MACRO DOMAIN A TARGET FOR ANTIVIRAL APPROACHES? .....	79
ANEXO C: A REVIEW OF THE ONGOING RESEARCH ON ZIKA VIRUS TREATMENT .....	99

## **1. Introdução**

### **1.1. Arboviroses**

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), arboviroses são doenças causadas por vírus que são mantidos na natureza e transmitidos entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por meio de artrópodes hematófagos (WHO., 1967).

As arboviroses afetam principalmente os países que estão entre os trópicos do hemisfério sul, isso porque estas regiões possuem parâmetros climáticos favoráveis para procriação de vetores artrópodes (LIANG; GAO; GOULD, 2015; MORENS; FAUCI, 2014). Os mosquitos do gênero *Aedes* estão entre os principais vetores artrópodes responsáveis pela transmissão dos vírus Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) e Mayaro (MAYV) e Febre Amarela (YFV) (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* desenvolvem todo o seu ciclo de vida em áreas urbanas e dessa maneira passaram a se alimentar de sangue humano, mesmo existindo a presença de outros mamíferos nas proximidades. Estes vetores se tornaram transmissores de patógenos que utilizam do mosquito como ponte para o hospedeiro final (DELATTE et al., 2010; KAMGANG et al., 2012; PONLAWAT et al., 2005). Kraemer e colaboradores (2015) mostraram que o mosquito também se adapta em diferentes regiões climáticas, o que aumenta sua ocupação geográfica e conseqüentemente a possibilidade de transmissão de arboviroses para humanos (KRAEMER et al., 2015).

Nos últimos anos diversos surtos relacionados à arboviroses vêm ocorrendo em todo o mundo (PETERSEN; POWERS, 2016). O aumento destes surtos tem sido motivo de preocupação para órgãos governamentais e pesquisadores, impulsionou pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de antivirais específicos e imunizantes contra arboviroses que diminuem a qualidade de vida dos afetados ou até mesmo os levam à óbito (GOULD et al., 2017)

### **1.2. Febre Chikungunya**

A Febre Chikungunya é a doença causada pelo CHIKV, transmitido principalmente pelos mosquitos do gênero *Aedes* (WEAVER, 2006). Inicialmente, as infecções causadas pelo CHIKV eram confundidas com as causadas pelo vírus da Dengue (LUMSDEN, 1955). Apenas anos mais tarde o CHIKV foi considerado uma arbovirose, quando o vírus foi isolado do soro de pacientes infectados, bem como de *Aedes aegypti* e

obtained in this study can contribute to the development of future drugs to treat Chikungunya fever lowering the social and economic impact of this virus in our society.

## References

- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral research**, v. 121, n. June, p. 59–68, set. 2015.
- ANTONINI, I. et al. N\*-N\*-S\* Tridentate ligand system as potential antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 1181–1184, out. 1981.
- BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. **Journal of Visualized Experiments**, n. 93, 4 nov. 2014.
- BHARTI, N. et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 23, p. 3475–3478, dez. 2002.
- CAMPOS, G. R. F. et al. Hepatitis C virus in vitro replication is efficiently inhibited by acridone Fac4. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 7, p. 1693–1701, 2017a.
- CAMPOS, G. R. F. et al. Hepatitis C virus in vitro replication is efficiently inhibited by acridone Fac4. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 7, p. 1693–1701, 1 jul. 2017b.
- CASAS, J. S.; GARCÍA-TASENDE, M. S.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 209, n. 1, p. 197–261, nov. 2000.
- CDC. Countries and territories where chikungunya cases have been reported. **Centers of Disease Control and Prevention**, p. 1, 2019.
- CORY, J. G. Ribonucleotide reductase as a chemotherapeutic target. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 27, p. 437–455, jan. 1988.
- DAVIS, J. L.; HODGE, H. M.; CAMPBELL, W. E. Growth of chikungunya virus in baby hamster kidney cell (BHK-21-clone 13) suspension cultures. **Applied microbiology**, v. 21, n. 2, p. 338–41, fev. 1971.
- DELANG, L. et al. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause

- resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2770–2784, 1 out. 2014.
- DEY, D. et al. The effect of amantadine on an ion channel protein from Chikungunya virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007548, 24 jul. 2019.
- DU, X. et al. Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695–2707, jun. 2002.
- GENOVA, P. et al. Toxic effects of bis(thiosemicarbazone) compounds and its palladium(II) complexes on herpes simplex virus growth. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, n. 2, p. 107–112, jun. 2004.
- GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One health (Amsterdam, Netherlands)**, v. 4, p. 1–13, dez. 2017.
- GRANDADAM, M. et al. Chikungunya virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 910–913, 2011.
- JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727–48, abr. 1997.
- KASUGA, N. C. et al. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 96, n. 2–3, p. 298–310, ago. 2003.
- KAUR, P. et al. Inhibition of Chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 155–167, 2013.
- KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 2002.
- LOUIE, A. Y.; MEADE, T. J. Metal Complexes as Enzyme Inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2711–2734, set. 1999.
- MATKOVIC, R. et al. The Host DHX9 DExH-Box Helicase Is Recruited to Chikungunya Virus Replication Complexes for Optimal Genomic RNA Translation. **Journal of Virology**, v. 93, n. 4, p. 1–17, 21 nov. 2018.



- MOHAN, A. et al. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian journal of dermatology**, v. 55, n. 1, p. 54–63, 2010.
- MOWATT, L.; JACKSON, S. T. Chikungunya in the Caribbean: An Epidemic in the Making. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 3, n. 2, p. 63–68, 2014.
- OLIVEIRA, C. G. et al. Cobalt(III) Complexes with Thiosemicarbazones as Potential anti-Mycobacterium tuberculosis Agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1848–1856, 2014.
- OO, A. et al. In silico study on anti-Chikungunya virus activity of hesperetin. **PeerJ**, v. 4, p. e2602, 26 out. 2016.
- PAIXÃO, E. S. et al. Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 7, p. 301–316, 1 jul. 2018.
- PANNING, M. et al. Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 416–422, mar. 2008.
- POHJALA, L. et al. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.
- QUEYRIAUX, B. et al. Clinical burden of chikungunya virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 2–3, 2008.
- REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.
- ROSS, R. W. The virus: Isolation, Pathogenic properties and relationship to the epidemic. **The Newala Epidemic**, p. 177–191, 1956.
- SAÚDE., M. DA S. DE V. EM. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), Semanas epidemiológicas 1 a 52. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2020a.
- SAÚDE., M. DA S. DE V. EM. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), Semanas epidemiológicas 1 a 14, 2020. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 51, n. 24, p. 1–13,

2020b.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1058–1070, 2006.

STEGMANN-PLANCHARD, S. et al. Chikungunya, a risk factor for Guillain-Barré syndrome. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 9 jul. 2019.

TEITZ, Y. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin- $\beta$ -4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin- $\beta$ -4':4'-diallythiosemicarbazone. **Antiviral Research**, v. 24, n. 4, p. 305–314, ago. 1994.

VEGA-RUA, A. et al. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.

VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 1 dez. 2010.

WADA, Y. et al. Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. **Virology**, v. 505, p. 102–112, maio 2017.

WEST, D. X. et al. Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 123, n. 1–2, p. 49–71, fev. 1993.

WHO. Guidelines on Clinical Management of Chikungunya Fever. **World Health Organization**, 2008.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S441–S445, 2016.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**, v. 29, n. 20, p. 2588–2595, 2013.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 40, 2008.