

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TAYNÁ BRUNO GARCIA DE FARIA

**TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS INIBIDORES PARA O MACRODOMÍNIO  
nsP3 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

UBERLÂNDIA – MG

AGOSTO DE 2022

TAYNÁ BRUNO GARCIA DE FARIA

**TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS INIBIDORES PARA O MACRODOMÍNIO  
nsP3 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau  
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

UBERLÂNDIA – MG

AGOSTO DE 2022

TAYNÁ BRUNO GARCIA DE FARIA

**Triagem virtual de potenciais inibidores para o macrodomínio nsP3 do Vírus  
Chikungunya**

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau  
de Bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior – IBTEC

Presidente

---

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos – IBTEC

Membro

---

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior – ICBIM

Membro

Uberlândia – MG, 18 de agosto de 2022

TAYNÁ BRUNO GARCIA DE FARIA

**Triagem virtual de potenciais inibidores para o macrodomínio nsP3 do Vírus  
Chikungunya**

Aprovado pela Banca Examinadora em: 18/08/2022

Nota: 100

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia - MG, 18 de agosto de 2022

## AGRADECIMENTOS

*Chega ao fim mais um ciclo da minha vida e agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado chegar até aqui. Aos meus pais, Ana Lúcia e Wilmar, por toda a dedicação durante os meus 25 anos, por me ensinarem a ter fé e a nunca desistir de lutar pelos meus propósitos. Aos meus avós, tios e primos que sempre estiveram por perto me incentivando.*

*Ao meu namorado Otávio e aos meus amigos mais próximos que sempre estiveram presentes nos melhores e piores momentos da minha vida, me dando suporte e me incentivando sempre.*

*Aos professores do Curso de Graduação em Biotecnologia que sempre estiveram dispostos a contribuir para um melhor aprendizado e experiência, em especial ao professor Nilson que aceitou ser meu orientador, me acompanhando e dando todo o auxílio necessário para a elaboração desse projeto, permitindo-me chegar hoje ao fim desse ciclo de maneira satisfatória.*

## RESUMO

O Vírus Chikungunya (CHIKV) é um vírus que pertence à família *Togaviridae*, do gênero *Alphavirus* e os vetores de transmissão são mosquitos fêmeas infectados das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O genoma do CHIKV possui quatro proteínas não estruturais (nsP1, 2, 3 e 4) e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1). A proteína nsP3 apresenta um macrodomínio (MD) que exerce um papel fundamental no processo de replicação do RNA viral e no início da infecção, visto que, possui atividade enzimática mono (ADP-ribose) (MAR) hidrolase, que quebra a ligação entre os resíduos de ADP-ribose (ADPr) e as proteínas mono ADP-ribosiladas (MARiladas). Por meio de mecanismos não elucidados, o macrodomínio nsP3 (nsP3MD) em complexo com a ADPr impede que a célula infectada sofra morte celular programada. Atualmente, o Food and Drug Administration (FDA) não possui um tratamento antiviral específico para prevenir ou tratar a Chikungunya. Desse modo, há a necessidade de desenvolver fármacos, capazes de prevenir ou tratar a infecção causada pelo Vírus Chikungunya. O nsP3MD pode ser um alvo farmacológico promissor para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de um tratamento anti-CHIKV específico, uma vez que, compostos que afetam a atividade enzimática mono (ADP-ribose) (MAR) hidrolase, podem ser eficazes em afetar a capacidade de replicação do RNA viral e em retardar o início da infecção. O presente estudo através da construção de um modelo baseado em forma, triagem virtual nos bancos de dados de confôrmeros, ancoragem molecular e análises de toxicidade *in silico*, buscou potenciais ligantes para o macrodomínio nsP3, que possam impedir a replicação do RNA viral e a proliferação da infecção causada pelo CHIKV. Sendo assim, foi possível selecionar quatro compostos com uma maior afinidade com o nsP3MD, que com a continuação dos estudos podem se tornar antivirais contra o Vírus Chikungunya.

**Palavras-chave:** CHIKV, proteína nsP3, triagem virtual.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização do genoma do CHIKV .....	8
Figura 2. Representação do modelo baseado na forma da molécula de ADP-ribose .....	15
Figura 3. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto output_651258_4_12 do banco de dados CL .....	18
Figura 4. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto output_129978_1_188 do banco de dados EXP .....	18
Figura 5. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto ZINC09668124_5_21 do banco de dados Drugs Now (ZINC) .....	19
Figura 6. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto ZINC000001999441_1_54 do banco de dados FDA (ZINC) .....	19
Figura 7. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto NuBBE_557_6_126 do banco de dados NuBBE .....	19
Figura 8. Diagrama 2D da interação do ligante “output_212805_4_96” extraído do banco de dados CL. As interações representadas pela cor verde claro são as forças de van der Waals e pela cor verde escuro são as ligações de hidrogênio. Já as cores laranja e rosa representam as interações hidrofóbicas .....	24
Figura 9. Diagrama 2D da interação do ligante “output_147873_5_121” extraído do banco de dados EXP. As interações representadas pela cor verde claro são as forças de van der Waals e pela cor verde escuro são as ligações de hidrogênio. Já a cor rosa representa as interações hidrofóbicas .....	25
Figura 10. Diagrama 2D da interação do ligante “ZINC71837492_8_23” extraído do banco de dados Drugs Now (ZINC). As interações representadas pela cor verde claro são as forças de van der Waals e pela cor verde escuro são as ligações de hidrogênio. Já as cores laranja e rosa representam as interações hidrofóbicas .....	26
Figura 11. Diagrama 2D da interação do ligante “NuBBE_981_2_168” extraído do banco de dados NuBBE. As interações representadas pela cor verde claro são as forças de van der Waals e pela cor verde escuro são as ligações de hidrogênio. Já a cor rosa representa as interações hidrofóbicas .....	27

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
1.1. O Vírus Chikungunya .....	8
1.2. Macrodomínio nsP3 .....	9
1.3. Tratamento .....	10
1.4. Triagem Virtual .....	11
2. OBJETIVOS .....	11
2.1. Objetivos Gerais .....	11
2.2. Objetivos Específicos .....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
3.1. Seleção e construção do modelo baseado na forma da ADP-ribose .....	12
3.2. Seleção e preparação de bancos de dados de confôrmeros .....	13
3.3. Triagem virtual em bancos de dados de confôrmeros .....	13
3.4. Ancoragem molecular .....	14
3.5. Análises de toxicidade <i>in silico</i> .....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
4.1. Construção do modelo baseado em forma .....	14
4.2. Preparação de bancos de dados de confôrmeros .....	15
4.3. Triagem virtual em bancos de dados de confôrmeros .....	16
4.4. Ancoragem molecular .....	16
4.5. Análises de toxicidade <i>in silico</i> .....	20
4.6. Diagramas 2D das interações proteína-ligante .....	24
5. CONCLUSÃO .....	29
6. REFERÊNCIAS .....	30

# 1. INTRODUÇÃO

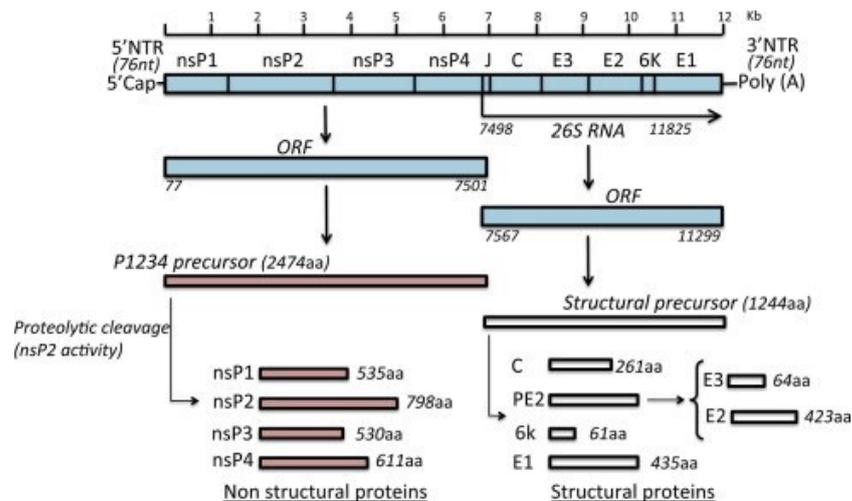
## 1.1. O Vírus Chikungunya

O Vírus Chikungunya (CHIKV) é um vírus de RNA de cadeia positiva, esférico, envelopado e um diâmetro de 65-70 nm, que pertence à família *Togaviridae*. Esse vírus foi descrito pela primeira vez na província meridional da Tanzânia (África) em 1952 e, é transmitido aos seres humanos através da picada de mosquitos fêmeas infectados das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (THIBERVILLE et al., 2013).

O CHIKV possui um genoma de cadeia simples e com aproximadamente 12 kb de comprimento (THIBERVILLE et al., 2013). Por meio do sequenciamento parcial da glicoproteína E1 do envelope viral pode ser agrupado em quatro genótipos diferentes: (1) Genótipo Leste-centro-sul africano (ECSA), (2) Genótipo da África Ocidental, (3) Genótipo da Ásia e (4) Genótipo do Oceano Índico (IOL) (WILL et al., 2021).

O genoma do Vírus Chikungunya possui dois quadros de leitura abertos (do inglês, Open Reading Frames - ORFs), que são separados por uma região de junção não traduzida (J) (THIBERVILLE et al., 2013). A ORF 5' é traduzida do RNA genômico e codifica uma poliproteína não estrutural, P1234 precursor, de 2.474 aminoácidos, que dão origem às quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) (VU et al., 2017). Essas proteínas possuem atividades enzimáticas diferentes, responsáveis pela replicação do RNA viral (ZHANG et al., 2021). Já a ORF 3' é traduzida a partir de um RNA 26S e codifica uma poliproteína estrutural, Structural precursor, de 1.244 aminoácidos, que dá origem às cinco proteínas estruturais, como a proteína do capsídeo (C) e as proteínas do envelope (E3, E2, 6K e E1) (Figura 1) (VU et al., 2017).

Figura 1. Organização do genoma do CHIKV.



Fonte: THIBERVILLE et al., 2013.

As proteínas do envelope, E2 e E1, são responsáveis pela ligação do vírus à membrana da célula hospedeira e, posteriormente pela a invasão celular (THIBERVILLE et al., 2013). Já as outras duas proteínas do envelope, E3 e 6K, são polipeptídeos líderes para as proteínas E2 e E1 e não são vistos em grande quantidade no vírion maduro (VU et al., 2017).

A infecção pelo Vírus Chikungunya representa um grande problema de saúde pública, visto que, o vírus se espalhou de países subtropicais da África e Ásia para países da Europa e das Américas. Segundo o Boletim Epidemiológico realizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), entre as semanas epidemiológicas (SE) 1 a 33 (02/01/2022 a 22/08/2022), ocorreram 159.876 casos prováveis de CHIKV no Brasil. Em comparação com o ano de 2021, houve um aumento de 91,3% de casos registrados até a respectiva semana. Até então, foram confirmados 60 óbitos para Chikungunya no Brasil e; 38 óbitos estão sendo investigados pela Vigilância Epidemiológica no país.

A doença manifesta-se como um quadro febril agudo associado a artralgias moderadas a intensas e outros sintomas, como: cefaleia, náuseas, erupções cutâneas, coceira e fadiga muscular intensa, similar ao quadro manifestado pela dengue (ZHANG et al., 2021). A infecção pode causar sequelas raras e mais preocupantes em neonatos e em idosos, na qual está associada à acometimento neurológico, como por exemplo: encefalites, Síndrome de Guillain-Barre. Os sintomas no estágio agudo têm duração aproximada de 7 dias e, no estágio crônico podem durar meses ou anos.

## 1.2. Macrodomínio nsP3

A proteína nsP3 do Vírus Chikungunya possui um macrodomínio (MD) altamente conservado na extremidade N-terminal da cadeia peptídica de todos os genótipos. Segundo trabalhos recentes o macrodomínio nsP3 (nsP3MD) possui atividade enzimática mono (ADP-ribose) (MAR) hidrolase, que atua ligando-se e hidrolisando a ligação entre os resíduos de ADP-ribose (ADPr) e as proteínas mono ADP-ribosiladas (MARiladas) (ABRAHAM et al., 2018).

O nsP3MD em complexo com a ADPr é essencial para o processo de amplificação do complexo de replicação do RNA viral e para iniciar a infecção. Visto que, a molécula de ADP-ribose, por meio de mecanismos não elucidados até o momento, impede que a célula infectada sofra apoptose (ABRAHAM et al., 2018). Portanto, o macrodomínio nsP3 pode ser um alvo farmacológico promissor para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de um tratamento anti-CHIKV específico.

Compostos capazes de inibir a atividade enzimática mono (ADP-ribose) (MAR) hidrolase, podem ser eficientes em afetar a capacidade de replicação do RNA viral e em retardar o início da infecção, tornando o CHIKV incapaz de realizar sua função nas células humana (ZHANG et al., 2021).

### **1.3. Tratamento**

Atualmente, não existe um tratamento antiviral específico aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para prevenir ou tratar a infecção causada pelo Vírus Chikungunya (ZHANG et al., 2021). Dessa maneira, o tratamento ocorre quando há sintomas e consiste em adotar medidas de suporte, incluindo repouso, reidratação e a administração de medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e antipiréticos, nos quais têm o objetivo de diminuir a gravidade dos sintomas (WILL et al., 2021).

No entanto, é necessário um cuidado especial na abordagem do tratamento da infecção aguda. Uma vez que, o tratamento feito de maneira inadequada, pode provocar a piora dos sintomas e desencadear o estágio crônico da doença. Devido à inexistência de um

tratamento anti-CHIKV específico, há a necessidade de desenvolver fármacos, visando a prevenção ou tratamento da infecção causada pelo CHIKV (WILL et al., 2021).

#### **1.4. Triagem Virtual**

A triagem virtual (VS, do inglês “Virtual Screening”) é uma técnica computacional que desempenha um papel essencial no processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos para prevenir ou tratar os vários tipos de doenças existentes no mundo (GRAFF et al., 2021). O processo de triagem virtual utiliza programas computacionais, que auxiliam os pesquisadores na seleção e na avaliação, *in silico*, de grandes bancos de dados de compostos, com o objetivo principal de identificar compostos com maior probabilidade de se ligar a um alvo biológico em um processo bioquímico específico (BORGES, 2019). Essa técnica, por não incluir compostos indesejáveis, preditos como inativos, reduzem o número de falhas e, torna o processo mais barato e mais rápido (SOUSA et al., 2020).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Procurar potenciais ligantes para a estrutura tridimensional do macromódulo nsP3 do Vírus Chikungunya através da construção de um modelo baseado em forma, triagem virtual e da ancoragem molecular.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Construir um modelo baseado na forma da ADP-ribose, extraída do complexo com o macromódulo nsP3 do Vírus Chikungunya;

- Realizar a triagem virtual nos bancos de dados de confôrmeros, com base no modelo baseado em forma;
- Realizar a ancoragem molecular, a partir dos resultados da triagem virtual;
- Analisar as interações ligante-receptor através das funções de pontuação dos compostos;
- Analisar a toxicidade, *in silico*, dos compostos selecionados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Seleção e construção do modelo baseado na forma da ADP-ribose

Visando à triagem virtual em bancos de dados de confôrmeros, extraiu-se a estrutura do macrodomínio nsP3 do Vírus Chikungunya em complexo com a ADP-ribose do código identificador 6VUQ na plataforma Protein Data Bank (PDB) ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Posteriormente, com o auxílio do software BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 isolou-se a ADPr do nsP3MD, para a construção do modelo baseado em forma. Esta etapa foi realizada com o auxílio do software vROCS 3.4.3.0, OpenEye Scientific Software, Santa Fé, Novo México, EUA (HAWKINS et al., 2007).

O BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 é um software de modelagem molecular, com uma ampla coleção de recursos para visualizar e compartilhar dados de pequenas moléculas e macromoléculas. Nesse, é possível modificar a estrutura das moléculas de maneira correta e eficaz.

O software vROCS baseia-se no método de comparação de forma. Esse método tem o conceito de que as moléculas têm formas semelhantes e os seus volumes se sobrepõem corretamente. Apesar de, o vROCS basear-se primariamente no método de comparação de forma, é possível determinar para regiões específicas do modelo, características químicas retratadas como: aceptoras de hidrogênio, doadoras de hidrogênio, aníons, cátions, regiões de anéis aromáticos e hidrofóbicas (LINTZ, 2019).

### **3.2. Seleção e preparação de bancos de dados de confôrmeros**

Após a construção do modelo baseado em forma, selecionou-se bibliotecas de compostos originárias de cinco bancos de dados comerciais diferentes. Das quais, as bibliotecas de compostos DIVERSet<sup>TM</sup> CL e EXP são originárias da Chembridge Corporation, San Diego, California, EUA. Já as outras três bibliotecas de compostos são o Drugs Now e o Food and Drug Administration (FDA), ambas originárias do ZINC e; o Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), biblioteca de compostos originárias de produtos naturais brasileiros.

As cinco bibliotecas de compostos foram submetidas ao programa FILTER do OMEGA 4.1.2.0, OpenEye Scientific Software, Santa Fé, Novo México, EUA. O FILTER é um programa utilizado antes de gerar os bancos de dados de confôrmeros, com objetivo de filtrar e remover os compostos indesejáveis, como: os grandes polipeptídios e proteínas, compostos com baixa biodisponibilidade oral e com atividade tóxica (LINTZ, 2019).

Em seguida, as bibliotecas de compostos filtradas foram submetidas aos programas FixpKa e Tautomers do QUACPAC 2.1.3.0, OpenEye Scientific Software, Santa Fé, Novo México, EUA. O programa FixpKa enumera o pKa, com o objetivo de gerar compostos com os estados de ionização mais favoráveis para o pH = 7,4 do sangue. Já o programa Tautomers enumera os tautômeros de cada composto das bibliotecas utilizadas (SIVIERI, 2021). Posteriormente, as bibliotecas de compostos foram submetidas ao programa OMEGA 4.1.2.0, OpenEye Scientific Software, Santa Fé, Novo México, EUA, com o objetivo de gerar bancos de dados de confôrmeros bioativos (LINTZ, 2019).

### **3.3. Triagem virtual em bancos de dados de confôrmeros**

O modelo baseado em forma anteriormente construído serviu de base para a realização da triagem virtual nos bancos de dados de confôrmeros. Essa etapa foi realizada com o auxílio do software vROCS 3.4.3.0, OpenEye Scientific Software, Santa Fé, Novo México, EUA, que utiliza o método de sobreposição para encontrar os compostos semelhantes na

forma e nas características químicas. Pelo vROCS é possível realizar a triagem virtual de forma rápida, à uma taxa de 500 conformeros por segundo (LINTZ, 2019).

### **3.4. Ancoragem molecular**

As bibliotecas de compostos obtidas a partir da triagem virtual foram submetidas à etapa de ancoragem molecular. Essa etapa foi realizada com o auxílio do software GOLD, que utiliza um algoritmo genético, para acoplar ligantes flexíveis aos sítios de ligação de proteínas alvos (LINTZ, 2019).

### **3.5. Análises de toxicidade *in silico***

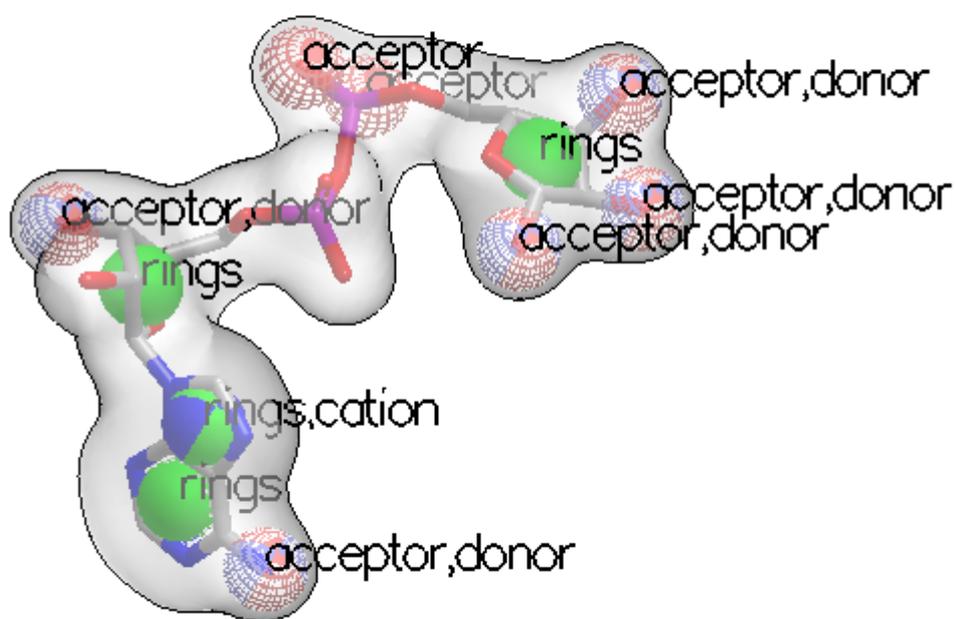
Os compostos escolhidos a partir da ancoragem molecular foram submetidos ao servidor pkCSM pharmacokinetics ([biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/](http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/)), para a realização das análises de toxicidade. Essa etapa é essencial para prever se os potenciais ligantes apresentam os parâmetros apropriados para o desenvolvimento de fármacos, visando a administração no organismo humano (BORGES, 2019).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Construção do modelo baseado em forma**

Com o auxílio do software vROCS 3.4.3.0, OpenEye Scientific Software, Santa Fé, Novo México, EUA foi possível avaliar as interações existentes na molécula de ADP-ribose e, construir um modelo baseado em forma (Figura 2), com tais características químicas: 4 pontos de anéis aromáticos (esferas verdes), 7 pontos de aceptores de hidrogênio (esferas vermelhas), 5 pontos de doadores de hidrogênio (esferas azuis), 1 ponto de cátion (esfera azul) e o corpo da molécula (cinza).

Figura 2. Representação do modelo baseado na forma da molécula de ADP-ribose. As esferas representadas pela cor verde são os pontos de anéis aromáticos, pela cor vermelha são os pontos de aceptores de hidrogênio e pela cor azul são os pontos de doadores de hidrogênio e cátions. Já a cor cinza representa o corpo do modelo baseado em forma.



Fonte: VIDA 5.0.1.0, 2022.

O modelo foi construído a partir da molécula de ADPr, visto que há relatos de pequenos fragmentos que se ligaram especificamente ao sítio de ligação da ADP-ribose no macrodomínio nsP3 e, apresentaram atividade anti-CHIKV (ZHANG et al., 2021). O modelo baseado em forma facilitará a identificação dos compostos semelhantes na forma e nas características químicas, durante o método de sobreposição.

#### 4.2. Preparação de bancos de dados de confôrmeros

Os bancos de dados comerciais são as fontes utilizadas para selecionar compostos promissores para o processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos. Uma vez que, esses podem oferecer compostos com o maior grau possível de diversidade molecular, sejam eles conhecidos por suas atividades biológicas e terapêuticas ou produtos de origens naturais.

Para tal propósito, as bibliotecas de compostos DIVERSet™ CL e EXP, Drugs Now, FDA e NuBBE foram preparadas com a intenção de remover os compostos indesejáveis e de gerar confôrmeros bioativos. Conseqüentemente, os bancos de dados gerados continham apenas compostos com características de fármacos.

#### **4.3. Triagem virtual em bancos de dados de confôrmeros**

Os bancos de dados de confôrmeros foram triados virtualmente com o auxílio do software vROCS 3.4.3.0, OpenEye Scientific Software, Santa Fé, Novo México, EUA. Esse software consegue prever e ranquear os 500 compostos com melhores pontuações para cada banco de dados escolhido. Os confôrmeros com melhores pontuações foram ranqueados conforme a função de pontuação TanimotoCombo, que estima o quanto os ligantes se adequaram a forma e as características químicas do modelo anteriormente construído. A triagem virtual tem o objetivo de identificar ligantes promissores com potencial atividade farmacológica.

#### **4.4. Ancoragem molecular**

Com o auxílio do software GOLD, os 500 compostos com melhores pontuações de cada banco de dados, foram submetidos à ancoragem molecular e, ranqueados conforme a função de pontuação padrão ChemPLP. As funções de pontuação são utilizadas para avaliar e diferenciar as inúmeras conformações e orientações que um mesmo ligante pode assumir no sítio de ligação do alvo molecular e, para estimar a afinidade de ligação dos inúmeros complexos ligante-receptor. Os 5 confôrmeros com melhores pontuações de cada banco de dados, foram selecionados para a realização das análises de toxicidade *in silico* (Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5).

Tabela 1: Compostos com melhores pontuações derivados do banco de dados DIVERSet™ CL.

<b>Ranking</b>	<b>Código do Ligante</b>	<b>ChemPLP</b>
1	output_651258_4_12	106,449
2	output_212805_4_96	100,253
3	output_416323_1_189	100,085
4	output_661959_1_115	99,5379
5	output_654233_3_3	99,179

Fonte: Autoria.

Tabela 2: Compostos com melhores pontuações derivados do banco de dados DIVERSet™ EXP.

<b>Ranking</b>	<b>Código do Ligante</b>	<b>ChemPLP</b>
1	output_129978_1_188	110,608
2	output_347916_16_46	108,716
3	output_146499_5_21	106,523
4	output_331353_2_143	105,677
5	output_147873_5_121	105,502

Fonte: Autoria.

Tabela 3: Compostos com melhores pontuações derivados do banco de dados Drugs Now (ZINC).

<b>Ranking</b>	<b>Código do Ligante</b>	<b>ChemPLP</b>
1	ZINC09668124_5_21	105,899
2	ZINC71837492_8_23	103,734
3	ZINC08687566_5_121	103,722
4	ZINC02709721_1_117	103,169
5	ZINC02561668_2_194	102,3

Fonte: Autoria.

Tabela 4: Compostos com melhores pontuações derivados do banco de dados FDA (ZINC).

<b>Ranking</b>	<b>Código do Ligante</b>	<b>ChemPLP</b>
1	ZINC000001999441_1_54	116,005
2	ZINC000000607986_1_109	115,846
3	ZINC000011681534_1_157	115,709
4	ZINC000005844792_1_194	114,477
5	ZINC000004213946_1_182	112,133

Fonte: Autoria.

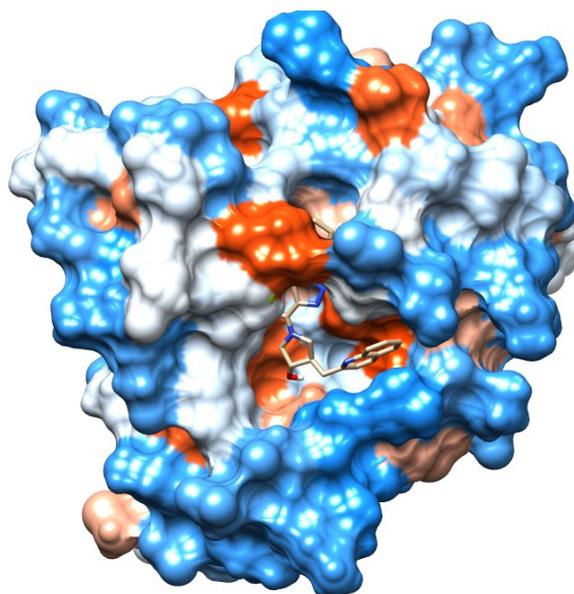
Tabela 5: Compostos com melhores pontuações derivados do banco de dados NuBBE.

<b>Ranking</b>	<b>Código do Ligante</b>	<b>ChemPLP</b>
1	NuBBE_557_6_126	113,892
2	NuBBE_2330_1_153	102,286
3	NuBBE_981_2_168	101,718
4	NuBBE_980_1_171	101,626
5	NuBBE_980_2_118	101,603

Fonte: Autoria.

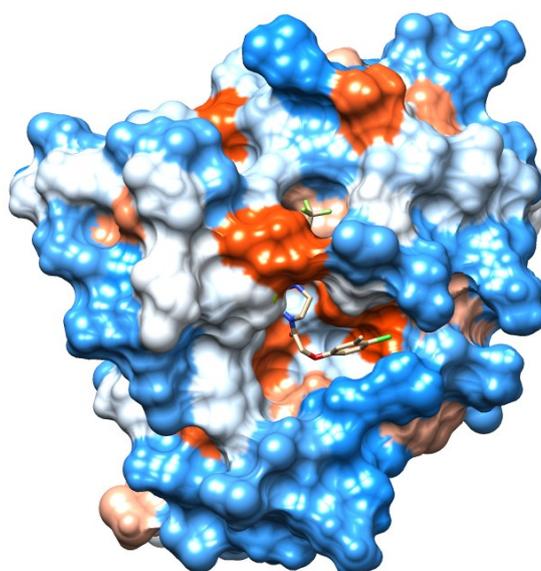
Os ligantes com as melhores pontuações em complexo com o alvo molecular, podem ser vistos nas Figuras 3, 4, 5, 6 e 7. Ao redor é possível observar o macrodomínio nsP3, no qual em azul temos os aminoácidos hidrofílicos e em laranja temos os aminoácidos hidrofóbicos. Já no meio é possível observar o ligante com melhor pontuação de cada banco de dados.

Figura 3. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto output\_651258\_4\_12 do banco de dados DIVERSet™ CL.



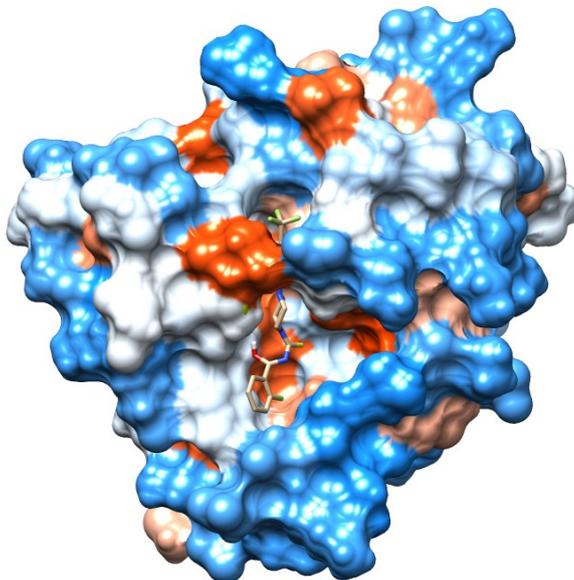
Fonte: Chimera 1.16, 2022.

Figura 4. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto output\_129978\_1\_188 do banco de dados DIVERSet™ EXP.



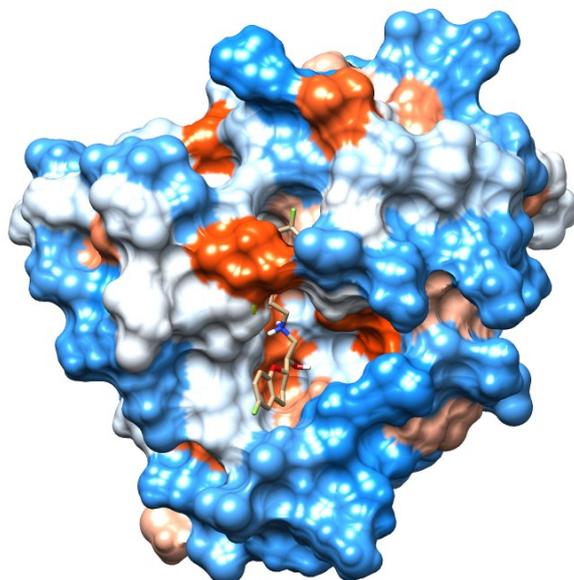
Fonte: Chimera 1.16, 2022.

Figura 5. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto ZINC09668124\_5\_21 do banco de dados Drugs Now (ZINC).



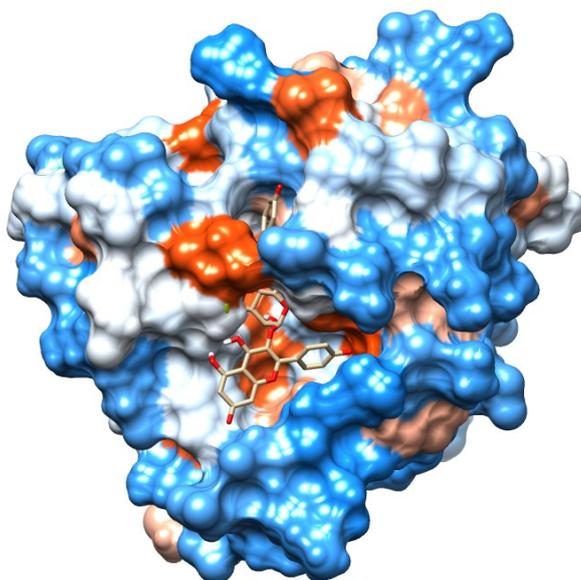
Fonte: Chimera 1.16, 2022.

Figura 6. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto ZINC000001999441\_1\_54 do banco de dados FDA (ZINC).



Fonte: Chimera 1.16, 2022.

Figura 7. Representação da estrutura 3D do macrodomínio nsP3 interagindo com o composto NuBBE\_557\_6\_126 do banco de dados NuBBE.



Fonte: Chimera 1.16, 2022.

#### 4.5. Análises de toxicidade *in silico*

As análises *in silico* permitem estudar as propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) e a toxicidade, de compostos com potenciais atividades farmacológicas. As análises *in silico* têm como vantagens a rapidez na realização, o baixo custo e a capacidade de diminuir a utilização de animais nos ensaios de toxicidade.

Os 5 compostos com melhores pontuações de cada banco de dados foram submetidos ao servidor pkCSM pharmacokinetics ([biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/](http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/)), para a predição de toxicidade (Tabelas 6, 6.1 e 6.2). As características de toxicidade analisadas foram: Toxicidade AMES, Dose Máxima Tolerada – Humana, Inibidores de hERG I e II, Toxicidade oral aguda em ratos (LD50), Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL), Hepatotoxicidade e Toxicidade em *T. pyriformis*.

O teste de Toxicidade AMES tem como objetivo avaliar o potencial mutagênico de um determinado composto em cepas de bactérias e, portanto, é considerado um dos métodos mais importantes na avaliação da segurança de compostos. Um teste positivo mostra que o composto é mutagênico, podendo agir como carcinogênico. Os compostos “output\_651258\_4\_12” do banco de dados DIVERSet™ CL, “output\_146499\_5\_21”, “output\_331353\_2\_143” e “output\_129978\_1\_188” do banco de dados DIVERSet™ EXP, “ZINC02709721\_1\_117”,

“ZINC02561668\_2\_194” e “ZINC09668124\_5\_21” do banco de dados Drugs Now (ZINC) possuem potencial mutagênico.

O teste de Dose Máxima Tolerada em Humanos fornece uma estimativa do limiar de dose tóxica de um determinado composto em humanos. Valores menores ou iguais a 0,477 log (mg/Kg/dia) são considerados baixos, isto é, a dose necessária para causar toxicidade em humanos é baixa. Já valores maiores a 0,477 log (mg/Kg/dia) são considerados altos, isto é, a dose necessária para causar toxicidade em humanos é alta. Apenas o composto “NuBBE\_980\_1\_171” do banco de dados NuBBE apresenta um valor maior que 0,477 log (mg/Kg/dia).

Os compostos inibidores dos genes hERG I e II provocam a inibição dos canais de potássio codificados por esses genes. Essa é a principal causa do desenvolvimento da síndrome do QT longo adquirido, na qual leva a arritmias ventriculares fatais. Várias substâncias foram retiradas de ensaios clínicos e do mercado farmacêutico devido as mortes associadas a inibição dos genes hERG I e II. Apenas o composto “ZINC02709721\_1\_117” do banco de dados Drugs Now (ZINC) possui atividade inibidora do gene hERG I e; 16 compostos dentre os escolhidos possuem atividade inibidora do gene hERG II.

O teste de Toxicidade Oral Aguda em Ratos fornece valores de dose letal (LD50) em ratos, para analisar a toxicidade relativa de diferentes compostos. O LD50 indica a quantidade, em mol/Kg, de um determinado composto, necessária para causar a morte de 50% do grupo dos animais testados.

O teste de Toxicidade Oral Crônica em Ratos tem como objetivo identificar a menor dose de um determinado composto, na qual pode ser observados efeitos adversos (LOAEL) no grupo tratado e, identificar a maior dose de um determinado composto, na qual nenhum efeito adverso é observado.

O teste de Hepatotoxicidade tem como objetivo avaliar o potencial de um determinado composto provocar um dano no fígado e, portanto, é considerado uma preocupação de segurança no desenvolvimento de fármacos. Compostos com pouco ou nenhum potencial hepatóxico são ideais para tratamentos a longo prazo, visto que a lesão hepática induzida pelo uso crônico de fármacos é intensificada com o tempo de tratamento. Os compostos “output\_146499\_5\_21” do banco de dados DIVERSet™ EXP, “ZINC02561668\_2\_194” e “ZINC09668124\_5\_21” do banco de dados Drugs Now (ZINC) e; “NuBBE\_2330\_1\_153” e

“NuBBE\_557\_6\_126” do banco de dados NuBBE não possuem potencial hepatóxico. Os demais compostos possuem potencial hepatóxico.

O teste de Toxicidade em *T. pyriformis* fornece valores da Concentração de Inibição de Crescimento (IGC50) nesses protozoários. O IGC50 indica a concentração, em log µg/L, de um determinado composto, necessária para inibir o crescimento das células de *T. pyriformis* em 50%. Valores maiores que -0,5 log µg/L são considerados tóxicos e, portanto, os 25 compostos com melhores pontuações são considerados tóxicos por esse parâmetro.

Os compostos “output\_212805\_4\_96” do banco de dados DIVERSet™ CL, “output\_147873\_5\_121” do banco de dados DIVERSet™ EXP, “ZINC71837492\_8\_23” do banco de dados Drugs Now (ZINC) e; “NuBBE\_981\_2\_168” do banco de dados NuBBE foram os que apresentaram melhores resultados nas análises de toxicidade, dentre os 5 melhores compostos de cada banco de dados, podendo ser os escolhidos como potenciais ligantes para o macrodomínio nsp3 do Vírus Chikungunya.

Tabela 6: Valores das predições de toxicidade dos 25 compostos com melhores pontuações.

<b>Código Ligante</b>	<b>AMES toxicity</b>	<b>Max. tolerated dose (human)</b>	<b>hERG I inhibitor</b>
output_661959_1_115	No	-0,341	No
output_651258_4_12	Yes	0,319	No
output_212805_4_96	No	-0,221	No
output_654233_3_3	No	-0,434	No
output_416323_1_189	No	-0,446	No
output_147873_5_121	No	-0,141	No
output_146499_5_21	Yes	-0,094	No
output_331353_2_143	Yes	-0,288	No
output_347916_16_46	No	0,085	No
output_129978_1_188	Yes	-0,244	No
ZINC02709721_1_117	Yes	-0,049	Yes
ZINC08687566_5_121	No	-0,141	No
ZINC71837492_8_23	No	0,406	No
ZINC02561668_2_194	Yes	0,094	No
ZINC09668124_5_21	Yes	-0,094	No
ZINC000011681534_1_157	No	-0,197	No
ZINC000000607986_1_109	No	-0,197	No
ZINC000004213946_1_182	No	-0,197	No
ZINC000001999441_1_54	No	-0,197	No
ZINC000005844792_1_194	No	-0,197	No
NuBBE_2330_1_153	No	0,121	No
NuBBE_980_2_118	No	0,312	No
NuBBE_981_2_168	No	0,254	No

NuBBE_557_6_126	No	-0,956	No
NuBBE_980_1_171	No	<b>0,539</b>	No

Fonte: Autoria.

Tabela 6.1: Valores das predições de toxicidade dos 25 compostos com melhores pontuações.

<b>Código Ligante</b>	<b>hERG II inibitor</b>	<b>Oral Rat Acute Toxicity (LD50)</b>	<b>Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)</b>
output_661959_1_115	Yes	2,829	1,214
output_651258_4_12	Yes	2,541	1,64
output_212805_4_96	No	2,341	2,577
output_654233_3_3	Yes	2,36	1,477
output_416323_1_189	Yes	2,489	0,219
output_147873_5_121	No	2,553	2,248
output_146499_5_21	No	2,645	2,173
output_331353_2_143	Yes	2,812	1,053
output_347916_16_46	Yes	2,921	2,355
output_129978_1_188	No	2,829	1,647
ZINC02709721_1_117	Yes	2,68	1,136
ZINC08687566_5_121	No	2,553	2,248
ZINC71837492_8_23	Yes	2,869	2,437
ZINC02561668_2_194	Yes	3,164	2,682
ZINC09668124_5_21	No	2,645	2,173
ZINC000011681534_1_157	Yes	2,277	1,961
ZINC000000607986_1_109	Yes	2,277	1,961
ZINC000004213946_1_182	Yes	2,277	1,961
ZINC000001999441_1_54	Yes	2,277	1,961
ZINC000005844792_1_194	Yes	2,277	1,961
NuBBE_2330_1_153	No	1,893	2,063
NuBBE_980_2_118	Yes	2,193	2,405
NuBBE_981_2_168	No	2,086	2,567
NuBBE_557_6_126	No	2,333	2,027
NuBBE_980_1_171	Yes	2,142	2,262

Fonte: Autoria.

Tabela 6.2: Valores das predições de toxicidade dos 25 compostos com melhores pontuações.

<b>Código Ligante</b>	<b>Hepatotoxicity</b>	<b>T.Pyriformis toxicity</b>
output_661959_1_115	Yes	0,442
output_651258_4_12	Yes	0,358
output_212805_4_96	Yes	0,314
output_654233_3_3	Yes	0,436
output_416323_1_189	Yes	0,398
output_147873_5_121	Yes	0,784
output_146499_5_21	No	0,991

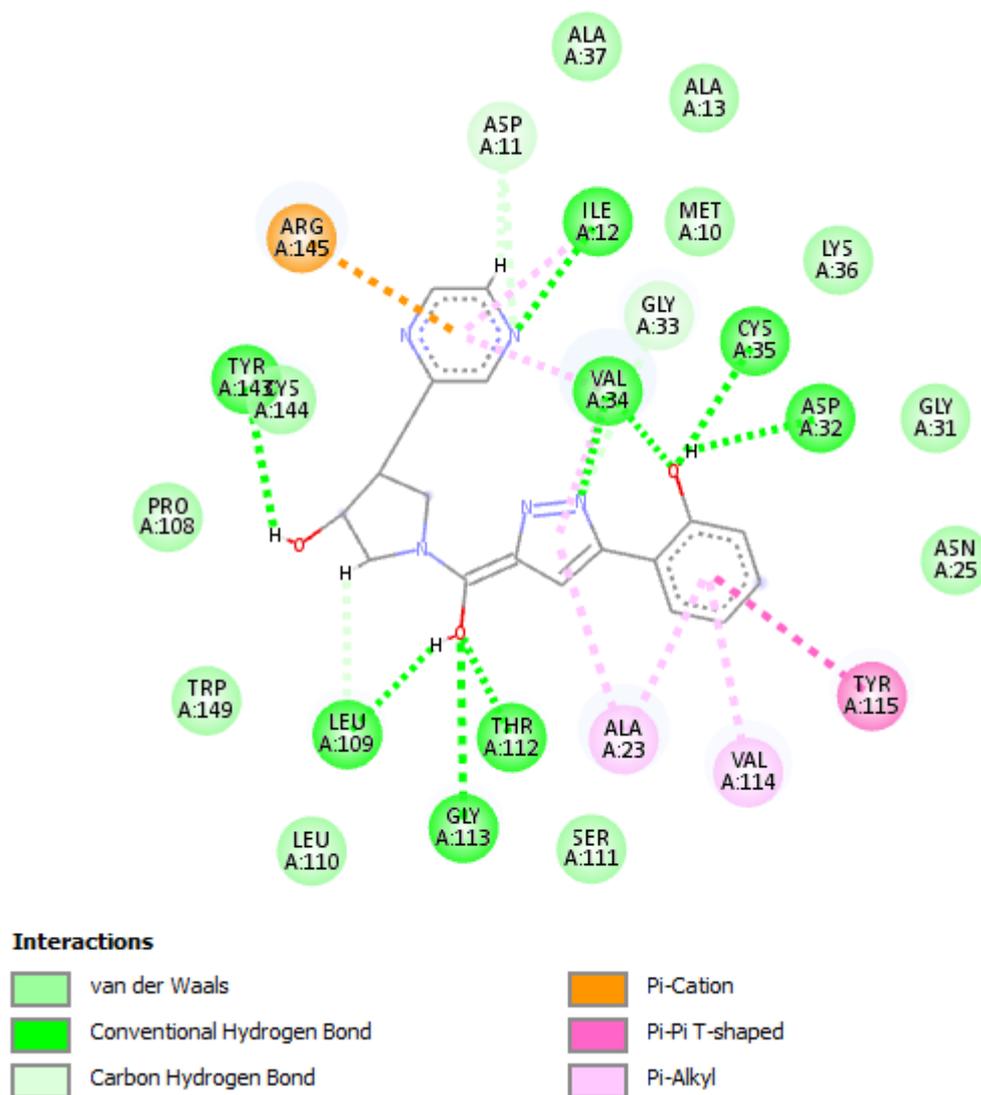
output_331353_2_143	Yes	0,314
output_347916_16_46	Yes	0,29
output_129978_1_188	Yes	0,995
ZINC02709721_1_117	Yes	0,285
ZINC08687566_5_121	Yes	0,784
ZINC71837492_8_23	Yes	0,285
ZINC02561668_2_194	No	0,43
ZINC09668124_5_21	No	0,991
ZINC000011681534_1_157	Yes	0,3
ZINC000000607986_1_109	Yes	0,3
ZINC000004213946_1_182	Yes	0,3
ZINC000001999441_1_54	Yes	0,3
ZINC000005844792_1_194	Yes	0,3
NuBBE_2330_1_153	No	0,392
NuBBE_980_2_118	Yes	0,496
NuBBE_981_2_168	Yes	0,489
NuBBE_557_6_126	No	0,285
NuBBE_980_1_171	Yes	0,457

Fonte: Autoria.

#### 4.6. Diagramas 2D das interações proteína-ligante

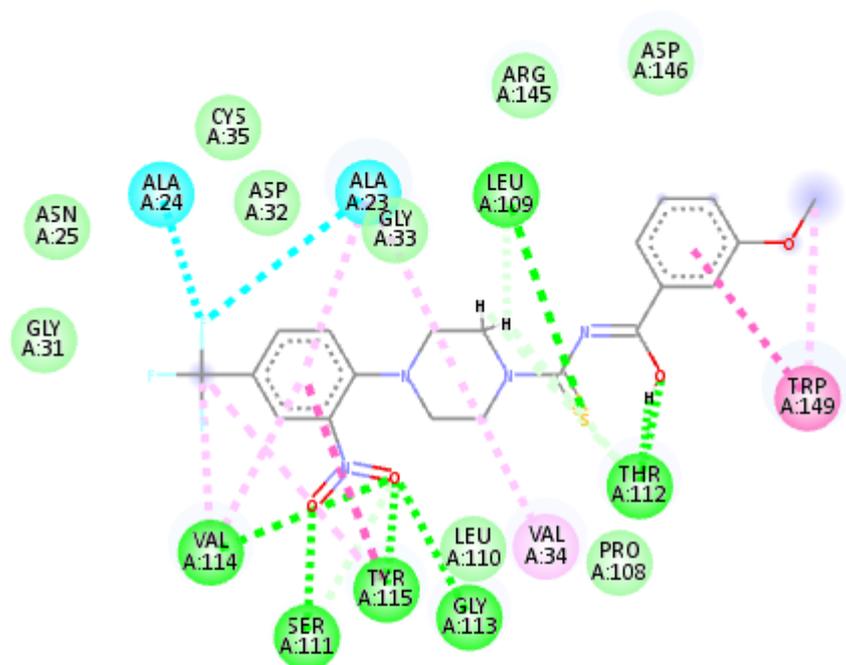
Os diagramas 2D das interações do macrodomínio nsP3 com os compostos com os melhores resultados nas análises de toxicidade, foram gerados com o auxílio do software BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Figura 8. Diagrama 2D da interação do ligante “output\_212805\_4\_96” extraído do banco de dados CL. As interações representadas pela cor verde claro são as forças de van der Waals e pela cor verde escuro são as ligações de hidrogênio. Já as cores laranja e rosa representam as interações hidrofóbicas.



Fonte: BIOVIA Discovery Studio Visualizer. 2022.

Figura 9. Diagrama 2D da interação do ligante “output\_147873\_5\_121” extraído do banco de dados EXP. As interações representadas pela cor verde claro são as forças de van der Waals e pela cor verde escuro são as ligações de hidrogênio. Já a cor rosa representa as interações hidrofóbicas.

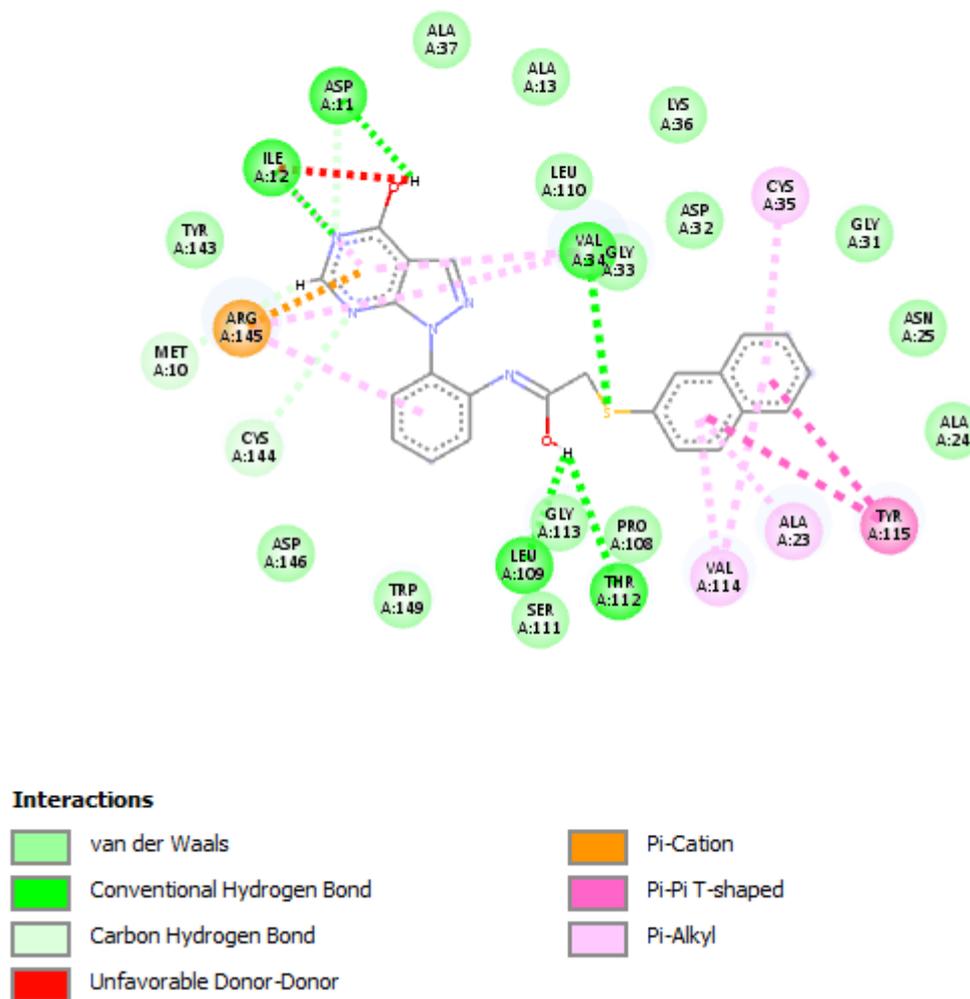


**Interactions**

	van der Waals		Pi-Pi Stacked
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Pi T-shaped
	Carbon Hydrogen Bond		Alkyl
	Halogen (Fluorine)		Pi-Alkyl

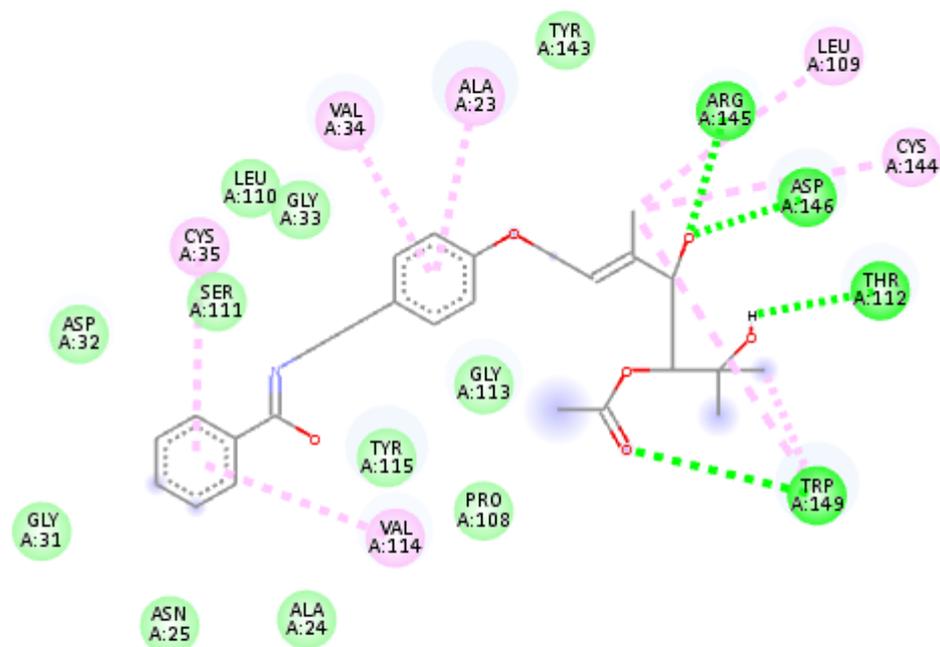
Fonte: BIOVIA Discovery Studio Visualizer. 2022.

Figura 10. Diagrama 2D da interação do ligante “ZINC71837492\_8\_23” extraído do banco de dados Drugs Now (ZINC). As interações representadas pela cor verde claro são as forças de van der Waals e pela cor verde escuro são as ligações de hidrogênio. Já as cores laranja e rosa representam as interações hidrofóbicas.



Fonte: BIOVIA Discovery Studio Visualizer. 2022.

Figura 11. Diagrama 2D da interação do ligante “NuBBE\_981\_2\_168” extraído do banco de dados NuBBE. As interações representadas pela cor verde claro são as forças de van der Waals e pela cor verde escuro são as ligações de hidrogênio. Já a cor rosa representa as interações hidrofóbicas.



#### Interactions

	van der Waals		Alkyl
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Alkyl

Fonte: BIOVIA Discovery Studio Visualizer. 2022.

O composto “**output\_212805\_4\_96**” extraído do banco de dados DIVERSet™ CL (Figura 7) se destacou por realizar uma maior quantidade de ligações de hidrogênio com o nsP3MD, quando comparado aos outros compostos. A maior quantidade de ligações de hidrogênio indica uma maior estabilidade do composto na interação com o macrodomínio nsP3.

A ligação de hidrogênio é uma interação atrativa que acontece entre um átomo de hidrogênio de uma molécula com átomos altamente eletronegativos, como nitrogênio, oxigênio e flúor. Sabe-se que a ligação de hidrogênio é o tipo de interação mais intensa e a mais importante em sistemas biológicos, sendo na maior parte responsáveis pela manutenção das conformações bioativas de proteínas. A energia eletrostática e a baixa energia de repulsão são os fatores energéticos que mais contribuem para a estabilidade de compostos (BORGES, 2019).

## 5. CONCLUSÃO

Com a ajuda da triagem virtual, tem-se a possibilidade de avaliar um grande número de compostos, a fim de descobrir potenciais ligantes para o tratamento dos diversos tipos de doenças existentes no mundo. Para que um composto seja considerado um potencial ligante, é necessário apresentar características que o torne seguro para ser administrado em humanos.

Os processos realizados neste trabalho demonstraram ser úteis em relação à exclusão de compostos que mostraram ser tóxicos durante a identificação de potenciais candidatos a ligantes do macrodomínio nsP3 e, geraram resultados satisfatórios como a obtenção de quatro prováveis potenciais ligantes para a estrutura tridimensional do nsP3MD do Vírus Chikungunya.

Os compostos **“output\_212805\_4\_96”** do banco de dados DIVERSet™ CL, **“output\_147873\_5\_121”** do banco de dados DIVERSet™ EXP, **“NuBBE\_981\_2\_168”** do banco de dados NuBBE e **“ZINC71837492\_8\_23”** do banco de dados Drugs Now (ZINC) com a continuação dos estudos, podem se tornar antivirais contra o CHIKV que ainda assola a população de países subtropicais da África e Ásia e países da Europa e das Américas.

Em suma, é possível concluir que ainda há um longo caminho a ser percorrido entre os processos apresentados neste trabalho e o desenvolvimento de um novo fármaco. Pois, é necessário que haja o refinamento e a melhoria, através de estudos *in vitro* e *in vivo*, dos compostos que foram apresentados nesta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, R. *et al.* ADP-ribosyl-binding and hydrolase activities of the alphavirus nsP3 macrodomain are critical for initiation of virus replication. **PNAS**, v. 115, n. 44, p. 457-466, 2018.

BORGES, Ana Luiza Araújo. **Triagem virtual de potenciais ligantes para a oncoproteína E6 do HPV tipo 16**. 2019. Monografia – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

GRAFF, D. E. *et al.* Accelerating high-throughput virtual screening through molecular pool-based active learning. **Chemical Science**, v. 12, n. 22, p. 7866-7881, 2021.

HAWKINS, P. C. D *et al.* Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. **J. Med. Chem**, v. 50, n. 1, p. 74-82, 2006.

LINTZ, Hugo Santos. **Triagem virtual de potenciais ligantes para a oncoproteína E6 do HPV tipo 16**. 2019. Monografia – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

SIVIERI, Vitória Juliane de Aquino. **Triagem virtual de potenciais inibidores para a proteína NS5 de Dengue vírus sorotipo 3**. 2021. Monografia – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.

SOUSA, A. C. C. D. *et al.* Virtual screening as a tool to discover new  $\beta$ -haematin inhibitors with activity against malaria parasites. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

THIBERVILLE, S. *et al.* Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **ELSEVIER**, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013.

VU, D. M. *et al.* Chikungunya Virus. **ELSEVIER**, v. 37, n. 2, p. 371-382, 2017.

WILL, R. B. *et al.* CHIKUNGUNYA: DOENÇA EMERGENTE NO BRASIL. **Saúde Dinâmica**, v. 3, n. 1, p. 35-48, 2021.

ZHANG, S. *et al.* Pyrimidone inhibitors targeting Chikungunya Virus nsP3 macrodomain by fragment-based drug design. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2021.