

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CAMPUS UMUARAMA
Instituto de Biotecnologia
Curso de Graduação em Biotecnologia

VINÍCIUS MAGALHÃES DE MOURA

**CONSTRUÇÃO DE MODELO E TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM FORMA
DE POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE NS2B-NS3 DO VÍRUS DA
DENGUE**

UBERLÂNDIA – MG

2022

VINÍCIUS MAGALHAES DE MOURA

**CONSTRUÇÃO DE MODELO E TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM FORMA DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE NS2B-NS3 DO VÍRUS DA DENGUE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Bioinformática

Orientador: Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

UBERLÂNDIA – MG

2022

VINÍCIUS MAGALHÃES DE MOURA

**CONSTRUÇÃO DE MODELO E TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM FORMA DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE NS2B-NS3 DO VÍRUS DA DENGUE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Bioinformática

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Prof. Dr. Diego Pandeló José

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior

Uberlândia, 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pela paciência e apoio ao longo do curso e pela fé que sempre depositaram na minha capacidade, que foi fundamental.

Agradeço aos amigos que fiz durante a graduação, em especial minhas amigas Fernanda, Serena, Laís e Karine, companhias inestimáveis durante esses anos.

Agradeço ao meu companheiro Diogo, por todo cuidado e estímulo que permitiram a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Nilson pela oportunidade e confiança.

RESUMO

O vírus da dengue é um membro do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* e inclui quatro sorotipos diferentes (DENV 1 A 4). Estimativas sugerem que metade da população vive em áreas de risco de infecção. Portanto, há uma necessidade urgente de identificar e desenvolver fármacos antivirais eficazes para esse vírus. Uma abordagem muito utilizada é a procura por compostos capazes de inibir a replicação viral. A proteína NS2B-NS3 tem papel importante na replicação do vírus sendo responsável pela clivagem de poliproteínas virais e consequente maturação da partícula viral, sendo um alvo interessante para desenvolvimento de drogas. Assim este trabalho propõe a construção de um modelo para triagem virtual de potenciais inibidores da protease NS2B-NS3 do vírus da dengue a partir dos bancos de dados Nubbe (produtos naturais) e ZINC (FDA - fármacos liberados pelo *Food and Drug Administration* dos EUA), análises de ancoragem molecular e estudo farmacocinético de toxicidade das melhores moléculas encontradas. Na triagem o programa VROCS gerou um ranking com os 500 melhores compostos que foram submetidos a ancoragem molecular pelo GOLD. A partir da ancoragem foi possível selecionar duas moléculas de cada banco com melhor score de ancoragem e estas submetidas a análise farmacocinética de toxicidade. Por fim, foi possível concluir que os compostos Candesartana e Derifenacina, apresentam potencial de inibição da replicação do vírus da dengue e os compostos do 2166 e 680, apesar de apresentarem bons resultados na ancoragem necessitam de maiores estudos em relação a sua atividade biológica.

Palavras-chave: vírus da dengue, NS2B-NS3, triagem virtual, ancoragem.

ABSTRACT

Dengue virus is a member of the Flavivirus genus of the Flaviviridae family and includes four different serotypes (DENV 1 to 4). Estimates suggest that half of the population lives in areas at risk of infection. Therefore, there is an urgent need to identify and develop effective antiviral drugs for this virus. A widely used approach is the search for compounds capable of inhibiting viral replication. The NS2B-NS3 protein plays an important role in virus replication, being responsible for the cleavage of viral polyproteins and consequent maturation of the viral particle, being an interesting target for drug development. Thus, this work proposes the construction of a model for virtual screening of potential inhibitors of the NS2B-NS3 protease of the dengue virus, in addition to using the Nubbe (natural products) and ZINC (FDA - drugs approved by the US Food and Drug Administration) databases, molecular anchoring analysis and pharmacokinetic toxicity study of the best molecules found. In the screening, the VROCS program generated a ranking with the 500 best compounds that were submitted to molecular anchorage by GOLD. From the anchoring, it was possible to select two molecules from each bank with the best anchoring score and these were subjected to pharmacokinetic toxicity analysis. and the compounds of 2166 and 680, despite presenting good results in anchoring, need further studies in relation to their biological activity.

Keywords: dengue virus, NS2B-NS3, virtual screening, docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização do genoma da poliproteína.....	14
Figura 2: Modelo baseado em forma do complexo alostérico NS2-NS3	20
Figura 3: Interação proteína-ligante bidimensional e estrutura tridimensional apontando a posição do composto no sítio ativo da proteína.....	22
Figura 4: Interação proteína-ligante bidimensional e estrutura tridimensional apontando a posição do composto no sítio ativo da proteína.....	23
Figura 5: Interação proteína-ligante bidimensional e estrutura tridimensional apontando a posição do composto no sítio ativo da proteína.....	24
Figura 6: Interação proteína-ligante bidimensional e estrutura tridimensional apontando a posição do composto no sítio ativo da proteína.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ranking TanimotoCombo após triagem no VROCS para os compostos do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE).	21
Tabela 2: Ranking TanimotoCombo após triagem no VROCS para os compostos do banco de dados do ZINC.	21
Tabela 3: Identificação e Score Chem_PLP dos compostos do Nubbe.....	22
Tabela 4: Identificação e Score Chem_PLP de compostos do ZINC.....	22
Tabela 5: Estudo farmacocinético de toxicidade realizado pelo pkCSM.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção

DENV – Vírus da dengue

FDA – Food and Drug Administration

LBVS – Triagem Virtual baseada em ligante

PDB – Protein Data Bank

SBVS – Triagem Virtual baseada em estrutura

VS – Triagem virtual

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O VÍRUS DA DENGUE	11
1.2 TRIAGEM VIRTUAL.....	13
1.3 NS2B/NS3 PROTEASE	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 SELEÇÃO E CONSTRUÇÃO DO MODELO BASEADO EM FORMA	17
3.2 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DOS BANCOS DE DADOS	17
3.3 TRIAGEM VIRTUAL.....	18
3.4 ANCORAGEM MOLECULAR.....	18
3.5 ANÁLISE DE TOXICIDADE IN SILICO	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO BASEADO EM FORMA	Erro! Indicador não definido.
4.2 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DE BANCOS DE DADOS	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS DA DENGUE

O vírus da dengue (DENV) é um membro do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* e inclui quatro sorotipos diferentes (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) (BARRETO-VIEIRA et al., 2021; HASAN et al., 2016).

Os DENVs são mantidos por um ciclo endêmico-epidêmico envolvendo humanos e o vetor mais representativo; o mosquito altamente domesticado, *Aedes aegypti*. Inicia-se com a infecção da fêmea do mosquito ao se alimentar de sangue contaminado durante a fase virêmica da doença. Durante sua incubação, o vírus infecta primeiro as células do intestino médio e depois se dissemina para se replicar em vários tecidos do mosquito, infectando as glândulas salivares. Uma vez que as glândulas salivares são infectadas, o mosquito se torna infectante por toda a sua vida e pode transmitir o vírus para outra pessoa durante a alimentação por sangue humano (GUZMAN et al., 2016).

O tempo desde a infecção até o início da doença em humanos varia de três a quatorze dias e tanto indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos podem transmitir o vírus da dengue aos mosquitos (GUZMAN et al., 2016). A infecção por DENV apresenta um quadro clínico diversificado, sendo geralmente caracterizada por febre e intensa dor corporal (RUT et al., 2020). Mas a doença varia de assintomática até a forma grave, com presença de febre hemorrágica; sendo uma infecção que afeta indivíduos de todas as faixas etárias (lactentes, crianças, adolescentes e adultos) e ocasiona risco de vida (HASAN et al., 2016).

As melhores estimativas sobre os vírus da dengue sugerem que mais da metade da população mundial (3,6 bilhões de pessoas) vive em áreas com risco de infecção e que anualmente ocorre 390 milhões de novas infecções por DENV, sendo 96 milhões com quadro sintomático, 10,2 milhões de quadros graves da doença e cerca de 20 mil óbitos por ano. (GUZMAN et al., 2016). O DENV é atualmente a causa de doença viral com transmissão por mosquitos mais comumente observada (CANNALIRE et al., 2018) e uma das doenças tropicais negligenciadas mais importantes do mundo (GUZMAN et al., 2016).

Historicamente, o primeiro caso de sintomas semelhantes ao da dengue foi relatado em Madras (atual Chennai), Índia, em 1780. Já a primeira epidemia de dengue comprovada virologicamente ocorreu em Calcutá e na costa leste da Índia entre 1963 e 1964. Posteriormente, devido ao aumento das taxas de crescimento populacional, aquecimento global, urbanização

não planejada, controle ineficiente de mosquitos, maior circulação mundial de pessoas e falta de instalações de saúde, os casos de dengue foram se ampliando (HASAN et al., 2016).

No Brasil, acredita-se que a primeira epidemia de dengue tenha ocorrido entre 1846 e 1853 nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro. Na época, a doença era conhecida por nomes como polca (dança da moda na época), febre da polca e febre quebra-ossos. Na literatura médica os casos de dengue devidamente relatados remetem ao primeiro quarto do século XX nas cidades de São Paulo (1916) e Niterói (1923). Já a primeira epidemia documentada do ponto de vista clínico e laboratorial ocorreu entre 1981-1982, em Boa Vista, Roraima; ocasionada pelos sorotipos dengue-1 (DENV-1) e dengue-4 (DENV-4) (MONTEIRO et al., 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a dengue um grande desafio global de saúde pública na grande zona intertropical do planeta. Desde a década de 1960 as ocorrências de dengue experimentaram uma grande evolução em todo mundo, aumentando em 30 vezes, com efeito direto em mais de 100 países, incluindo EUA e alguns países da Europa (HASAN et al., 2016). No Brasil, o clima predominantemente tropical favorece a proliferação da dengue em seus quatro sorotipos em circulação no país (DENV-1 a DENV-4), constituindo uma constante ameaça à população (MONTEIRO et al., 2019).

Devido à transmissão progressiva e ao aumento da gravidade da infecção por dengue, a necessidade de uma vacina segura, eficaz e econômica contra a dengue ganha importância considerável; alternativa que esbarra na complexidade patológica dos quatro sorotipos do vírus e em investimentos insuficientes para garantir o seu sucesso (HASAN et al., 2016).

Outras pesquisas avançadas sobre os DENV convergem no sentido de controlar a transmissão do vetor (mosquito) na água parada com uso de biotecnologia e, também, no desenvolvimento de medicamentos antivirais com o objetivo de prevenir e tratar a infecção da dengue e evitar os episódios de risco de vida (HASAN et al., 2016).

Em relação às terapias antivirais, não há medicamentos específicos em uso clínico e, portanto, há uma necessidade urgente de identificar e desenvolver agentes eficazes contra todos os sorotipos. Nesse sentido, uma estratégia validada consiste em bloquear a maquinaria de replicação viral visando principalmente as enzimas virais. Assim, é uma necessidade de saúde urgente e não atendida a identificação de novas classes químicas de inibidores do DENV (CANNALIRE et al., 2018).

1.2 TRIAGEM VIRTUAL

A triagem virtual (*virtual screening*) é um avanço tecnológico do final do século XX, cujo objetivo é a otimização de todo o processo de design de fármacos, com controle de custos, economia de tempo, redução do volume de informações e resíduos e síntese dos compostos de interesse por algoritmos eficientes e métodos aproximados (WALTERS, STAHL, MURCKO;1998). Desse modo, a triagem virtual é uma técnica poderosa para identificar moléculas de sucesso como pontos de partida para a química medicinal (LAVECCHIA et al., 2013).

Em anos recentes, a VS se tornou um importante parte do arsenal da descoberta moderna de drogas. Grande parte do impulso para usar a triagem virtual surgiu do aumento da pressão para colocar compostos no *pipeline* de desenvolvimento e reduzir os custos de obtenção de compostos adequados até este ponto (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007).

Com a triagem virtual, apenas compostos que “passam” em filtros de critérios de interesse são avaliados dentre milhões ou bilhões de moléculas disponíveis em conjuntos de grandes bibliotecas de compostos. Devido a utilização de química combinatória e triagem de alto rendimento é possível processar rapidamente elevado número de compostos virtuais. Em cada estágio, uma grande porcentagem de compostos é removida. Assim, o número de compostos que chegam aos estágios finais é apenas uma pequena fração do total; como consequência, mais tempo pode ser concedido na análise de cada molécula (MURCKO et al., 1998).

A triagem virtual pode ser dividida em duas grandes categorias, a saber: baseado em ligante (LBVS) e baseado em estrutura (SBVS). Estratégias de LBVS utilizam dados de atividade de estrutura de um conjunto de ativos conhecidos para identificar compostos candidatos para avaliação experimental. Já estratégias SBVS utilizam a estrutura tridimensional (3D) do alvo biológico para encaixar as moléculas candidatas e classificá-las com base em sua ligação prevista da afinidade ou complementaridade ao sítio de ligação (LAVECCHIA et al., 2013).

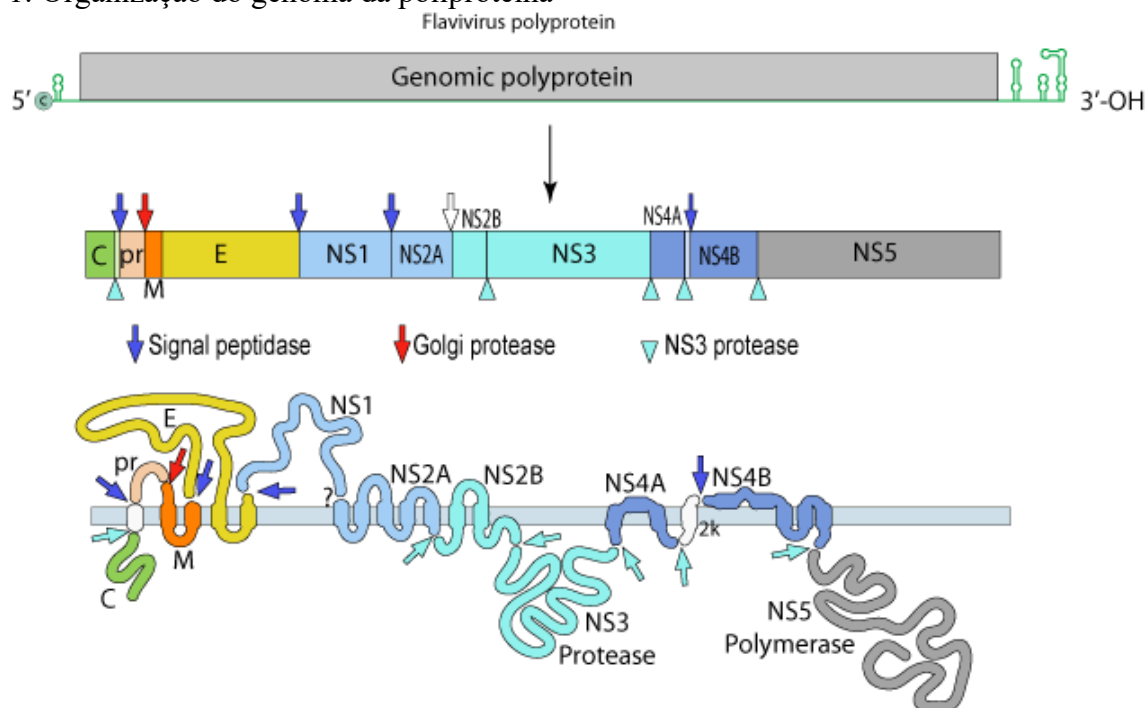
Avanços da triagem virtual permitem ainda a mudança no método convencional de um único processo de descoberta de medicamentos, possibilitam entender os mecanismos moleculares dos efeitos colaterais dos medicamentos e também redirecionar produtos farmacêuticos seguros. Assim, entendem-se que os métodos de VS desempenham um papel importante na pesquisa de descoberta de drogas (LAVECCHIA et al., 2013).

1.3 NS2B/NS3 PROTEASE

Geralmente os flavivírus são envelopados e compreendem um RNA de fita simples positivo ((+)ssRNA) com um tamanho de genoma de aproximadamente 11 Kb (DA SILVA-JÚNIOR; DE ARAÚJO-JÚNIOR, 2019).

O genoma do DENV (Figura 1) é traduzido em uma grande poliproteína clivada em três proteínas estruturais: a proteína precursora de membrana (prM), glicoproteína de envelope (E), importante para a entrada do vírus na célula, e capsídeo (C) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (DA SILVA-JÚNIOR; DE ARAÚJO-JÚNIOR, 2019).

Figura 1: Organização do genoma da poliproteína



Fonte: https://viralzone.expasy.org/43?outline=all_by_species

O genoma de RNA do vírus da dengue codifica essa única poliproteína, que precisa ser processada no lado citoplasmático da membrana do retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira pela protease NS2B/NS3 do DENV. Assim, para a maturação das partículas de DENV são requeridas etapas de clivagem adequada de poliproteínas. Nesse contexto, a protease NS2B/NS3 do DENV é responsável pela clivagem em 8 dos 13 sítios de clivagem de poliproteínas virais (LIN et al., 2017).

Como as proteases NS2B-NS3 encontradas nesses vírus são responsáveis pelo processamento de poliproteínas e conseqüentemente para a maturação da partícula viral, elas são consideradas alvos promissores para o desenvolvimento de medicamentos inibidores (LIN et al., 2017; RUT et al., 2020).

O desenvolvimento de inibidores do complexo enzimático NS2B-NS3 é considerado muito desafiador devido à natureza do sítio ativo (DA SILVA-JÚNIOR; DE ARAÚJO-JÚNIOR, 2019) e apesar de esforços substanciais de pesquisa e recentes desenvolvimentos promissores, os medicamentos antivirais de ação direta para DENV ainda não estão disponíveis para combater as infecções pelo vírus. (DA SILVA-JÚNIOR; DE ARAÚJO-JÚNIOR, 2019; LIN et al., 2017; RUT et al., 2020; WU et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Construir um modelo baseado em forma de um inibidor da protease NS2B-NS3 (vírus da dengue) extraído do Protein Data Bank (PDB) e realizar triagem virtual de compostos em bancos de dados selecionados para teste de ancoragem molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir modelo baseado em forma de um inibidor extraído do complexo proteico NS2B-NS3;
- Selecionar e preparar bancos de dados de compostos;
- Filtrar bancos de dados para exclusão de moléculas indesejadas;
- Fazer triagem virtual baseada em forma e analisar o score;
- Submeter moléculas selecionadas na triagem ao estudo de ancoragem molecular e análise da função ChemPLP dos melhores compostos;
- Estudar toxicidade in silico dos compostos selecionados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO E CONSTRUÇÃO DO MODELO BASEADO EM FORMA

Para a triagem em bancos de dados, foi extraída a estrutura de um inibidor alostérico do complexo NS2B-NS3 protease, essencial para replicação viral e, portanto, para alvo de drogas. O inibidor, ligado ao complexo proteico foi retirado da plataforma *Protein Data Bank* (PDB) (www.rcsb.org), código identificador 6MO0.

No software BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 isolou-se o inibidor, aqui identificado como composto 9 conforme Yao et al. (2019) do complexo NS2B-NS3 protease para construir o 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).

3.2 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DOS BANCOS DE DADOS

Nesta etapa foram selecionados dois bancos de dados comerciais de compostos, as bibliotecas do *Food and Drug Administration* (FDA), do ZINC e o Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), biblioteca de compostos de produtos naturais brasileiros.

Para a preparação dos bancos de dados escolhidos, foi utilizado o software FILTER do OMEGA 4.1.2.0, *OpenEye Scientific Software*, Santa Fé, Novo México, EUA.

FILTER é um ferramenta de filtragem e seleção molecular que usa uma combinação de cálculos de propriedades físicas e conhecimento de grupos funcionais para remover compostos indesejáveis antes que eles entrem na triagem experimental ou virtual (“Molecular Filtering Software | Filter”).

As propriedades indesejáveis incluem funcionalidades tóxicas, alta probabilidade de ligação covalente com a proteína alvo, interferência no ensaio experimental e/ou baixa probabilidade de biodisponibilidade oral (“Molecular Filtering Software | Filter”).

Após a filtragem, o OMEGA (versão 4.1.2.0) foi utilizado para criar as 500 conformações de menor energia de cada ligante nos banco de dados conforme descrito no trabalho de Venhorst, et al. (2008). Esta etapa é anterior a triagem virtual com cálculo de sobreposição realizada no vROCS.

3.3 TRIAGEM VIRTUAL

Devido à sua velocidade e bom desempenho em estudos de VS relatados anteriormente, ROCS foi escolhido como o método de VS baseado em ligante (VENHORST et al., 2008).

O ROCS classifica as moléculas com base de sua semelhança com uma molécula ativa conhecida, ou seja, ligante de referência, no espaço de forma 3D, usando funções gaussianas centradas no átomo para permitir maximização rápida da sobreposição molecular (volume e recursos), o chamado *Tanimoto ComboScore* (VENHORST et al., 2008).

O modelo baseado em forma construído foi usado como base para a realização da triagem virtual nos bancos de dados de confôrmeros. Na triagem foram selecionados os 500 melhores modelos para a etapa de ancoragem molecular.

3.4 ANCORAGEM MOLECULAR

A ancoragem de proteína-ligante continua a ser uma área de intenso interesse da indústria farmacêutica. A triagem virtual é comumente usada para gerar hits contra alvos de drogas para os quais a estrutura é conhecida, e o *docking* também é muito utilizado em projetos de design de drogas baseados em estrutura para priorizar os esforços da química medicinal (HARTSHORN et al., 2007).

Prever os modos de ligação e afinidades de compostos quando eles interagem com um sítio de ligação a proteínas está no centro do design de drogas baseado em estrutura. Conseqüentemente, o número de algoritmos disponíveis para proteína-ligante ancoragem é grande. DOCK,¹ FlexX,² PRO_LEADS,³ e GOLD são exemplos de programas de encaixe, mas muitos outros são relatados na literatura (VERDONK et al., 2003).

Nos estudos de Nissink et al (2002); o GOLD mostrou uma taxa de sucesso de 68% no conjunto de validação CCDC/Astex de 305 complexos extraídos do Protein Data Bank (PDB) e, portanto, foi escolhido neste trabalho como software para ancoragem molecular.

Como todos os outros programas de docking, o GOLD consiste em três partes principais: uma função de pontuação para classificar diferentes modos de ligação; um mecanismo para colocar o ligante no sítio de ligação; um algoritmo de pesquisa para explorar possíveis modos de ligação. (VERDONK et al., 2003).

O GOLD usa um algoritmo genético (GA) no qual os seguintes parâmetros são modificados/otimizados: (a) diedros de ligações rotativas de ligantes; (b) geometrias de anéis de ligantes (invertendo os cantos dos anéis); (c) diedros de grupos OH de proteínas e grupos

NH₃; e (d) os mapeamentos dos pontos de ajuste (isto é, a posição do ligante na local de ligação) (VERDONK et al., 2003).

Os melhores ligantes selecionados nas bibliotecas do FDA e NuBBe foram submetidos ao estudo de ancoragem no software GOLD, e a após o docking, as moléculas foram avaliadas pela pontuação ChemPLP. Esta função de pontuação é usada para modelar complementaridade estérica entre proteína e ligante (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009).

Nesta avaliação foram selecionadas duas moléculas de cada biblioteca.

3.5 ANÁLISE DE TOXICIDADE IN SILICO

A interação entre farmacocinética, toxicidade e potência é crucial para medicamentos eficazes. O perfil farmacocinético de um composto define suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015a).

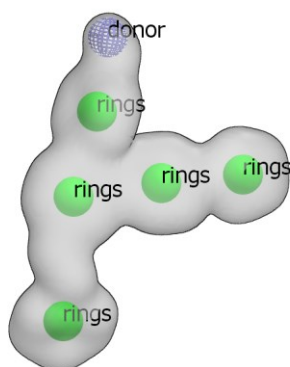
Nesta etapa do trabalho foi utilizado o programa pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) para análise de toxicidade das moléculas selecionadas no GOLD, que considera os parâmetros descritos por Pires et al. 2015 de LD50 em ratos, toxicidade para *T. Pyriformis*, teste de AMES e LC50 em camundongos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO BASEADO EM FORMA

Na figura 1 está representado o modelo baseado em forma obtido a partir do ligante identificado como Composto 9 por (YAO et al., 2019) extraído do complexo proteico NS2B-NS3, contendo um doador de hidrogênio (esfera azul) e 5 anéis aromáticos (esferas verdes).

Figura 2: Modelo baseado em forma do complexo alostérico NS2-NS3



Fonte: Organizado pelo autor

4.2 TRIAGEM VIRTUAL

Após a triagem virtual realizada no VROCS, é gerado um *output* com as 500 melhores pontuações TanimotoCombo.

A pontuação do TanimotoCombo pode assumir valores de 0,0 a 2,0; quando dois compostos estão perfeitamente alinhados (e, portanto, são idênticos estrutural e conformacionalmente), a pontuação do TanimotoCombo é 2,0 (TUCCINARDI et al., 2010).

Para os propósitos deste trabalho foram selecionadas as 5 melhores pontuações dos dois bancos de dados utilizados, Nubbe e Zinc, conforme representado nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Nubbe ID	TanimotoCombo
2162	0.7890
675	0.777
2166	0.7090
2002	0.6960
680	0.6830

Tabela 1: Ranking TanimotoCombo após triagem no VROCS para os compostos do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE).

ZINC ID	TanimotoCombo
1996117	0.9160
3810860	0.8840
1530689	0.8380
100055899	0.8280
4097427	0.8130

Tabela 2: Ranking TanimotoCombo após triagem no VROCS para os compostos do banco de dados do ZINC.

Na triagem virtual realizada, o valor máximo encontrado foi 0,9160 para o composto 1996117 e o menor valor foi 0,6830 para o composto 680.

4.3 ANCORAGEM MOLECULAR

A ancoragem molecular com o software GOLD gerou um relatório com as 500 melhores substâncias docadas dos dois bancos de dados utilizados.

O GOLD conta com uma variedade de funções de pontuação (GOLDScore, ChemScore, ASP e ChemPLP). Todas essas funções já foram bastante exploradas, e o ChemPLP foi o que apresentou melhores taxas médias de sucesso para os experimentos de previsão de pose do ligante e VS utilizando diversos conjuntos de testes de validação. Isso levou o ChemPLP a ser considerado a pontuação padrão ouro para o software GOLD. (SOUZA; VALLE; REIS, 2020)

O ChemPLP (Piecewise Linear Potential) é uma função de pontuação empírica otimizada para a previsão de pose. Usa em seus termos as ligações de hidrogênio e numerosos potenciais para modelar interações de van der Waals e potenciais de repulsão. O potencial linear das partes é usado para modelar a complementaridade estérica entre a proteína e o ligante. A função é para acoplamento covalente, considerando cadeias laterais flexíveis e moléculas de água explícitas na proteína (SOUZA; VALLE; REIS, 2020).

Portanto para este trabalho foram selecionadas duas moléculas com os melhores *score* PLP de cada banco de dados que estão listados nas tabelas 3 e 4 abaixo.

Nubbe ID	Chem PLP
2166	85.22
680	84.85

Tabela 3: Identificação e Score Chem_PLP dos compostos do Nubbe

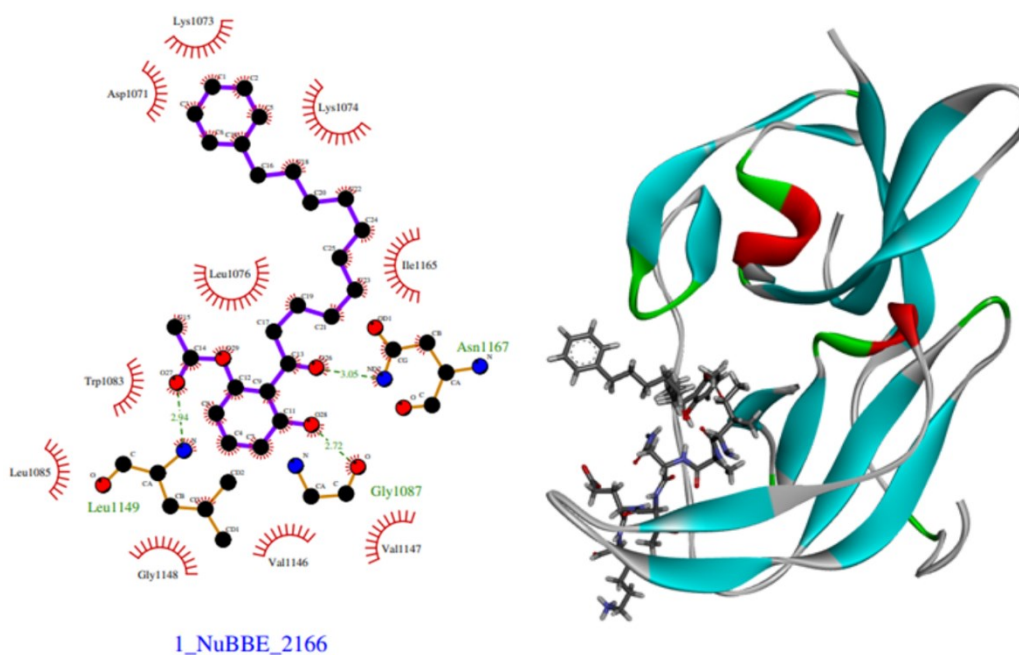
ZINC ID	Chem PLP
4097427	83.88
1996117	81.53

Tabela 4: Identificação e Score Chem_PLP de compostos do ZINC

É possível observar que em comparação as tabelas 1 e 2, os compostos com maiores pontuações do ChemPLP não são necessariamente os maiores para o TanimotoCombo. Porém, TUCCINARDI et al., 2010 estabeleceu uma correlação estatística em que compostos com maiores score TanimotoCombo e posteriormente submetidos ao docking pelo GOLD e analisados pelo ChemPLP apresentaram resultados confiáveis em mais 60% dos casos.

A figura 3 demonstra de forma bidimensional a interação da proteína ligante, contendo 3 pontes de hidrogênio (linha pontilhada verde) nos aminoácidos Asn1167, Gly1087 e Leu1149 e 10 ligações hidrofóbicas (estruturas ciliadas) nos aminoácidos Lys1073, Asp1071, Lys1074, Leu1076, Ile1165, Trp1083, Leu1085, Gly1148, Val1146 e Val1147.

Figura 3: Interação proteína-ligante bidimensional e estrutura tridimensional apontando a posição do composto no sítio ativo da proteína.



Fonte: Organizado pelo autor

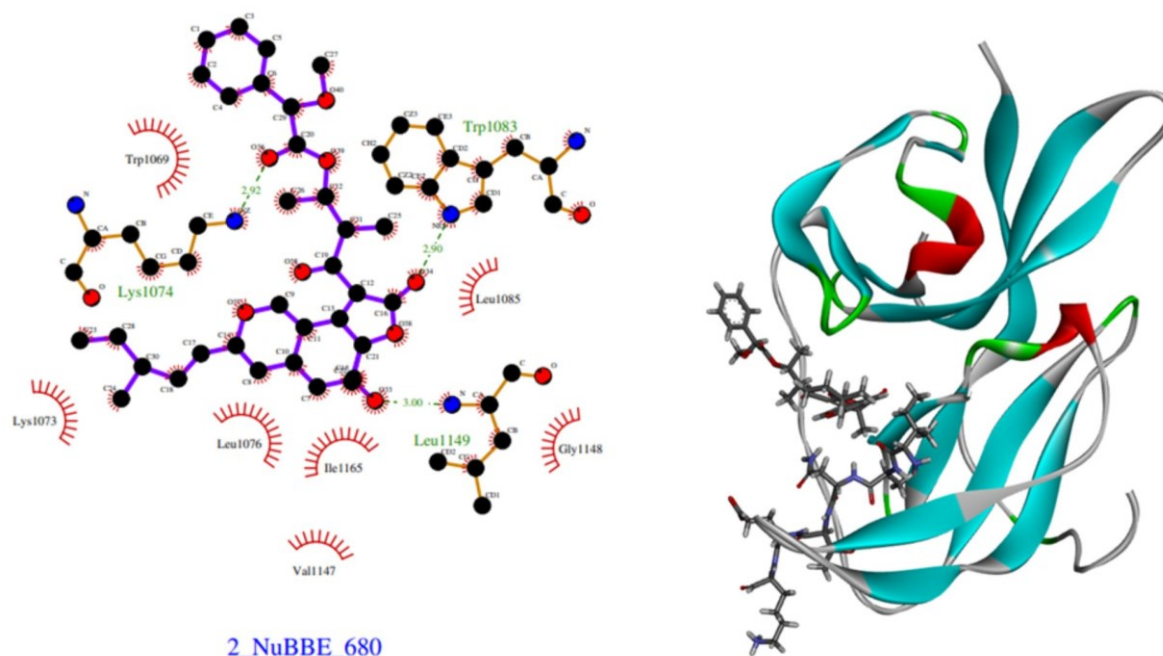
Esse composto selecionado é da classe química dos lignóides de origem semisintética, extraída e isolada da fruta de *Virola Sebifera*, conforme estudos de LOPES; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1982.

A *Virola Sebifera*, é uma espécie arbórea de nome comum Ucuuba-do-cerrado de ocorrência natural na Venezuela e no Brasil (“Ucuúba-do-Cerrado: *Virola sebifera*. - Portal Embrapa”, [s.d.]

A espécie foi relatada por produzir uma gordura que é valorizada para tratamento de reumatismo na Venezuela. Embora no Brasil essa gordura de “Ucuúba” seja utilizada para fins industriais, e a casca da árvore serve na preparação de rapés alucinógenos por indígenas da Amazônia (LOPES; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1982). Contudo, conforme informações extraídas do NuBBE, essa molécula não tem atividade biológica relatada na literatura.

A figura 4 apresenta a interação bidimensional da proteína-ligante, onde é possível identificar 3 pontes de hidrogênio (linha pontilhada verde) nos aminoácidos Lys1074, Trp1083 e Leu1149 e 7 ligações hidrofóbicas com os aminoácidos Trp1069, Leu1085, Lys1073, Leu1076, Ile1165, Gly1148 e Val1147.

Figura 4: Interação proteína-ligante bidimensional e estrutura tridimensional apontando a posição do composto no sítio ativo da proteína



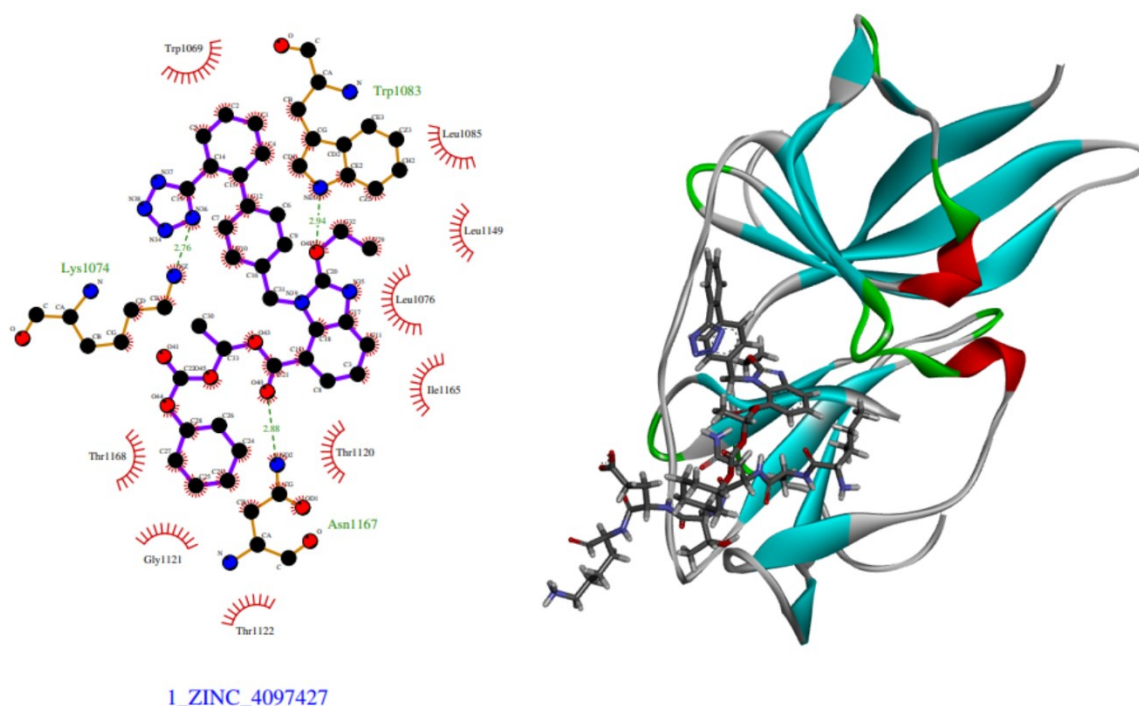
Fonte: Organizado pelo autor

Este composto descrito pelos trabalhos de BORGES et al., 2011 foi extraído de uma cepa de fungo endofítico *Chaetomium globosum*, isolada das folhas de *Viguiera robusta*

(Asteraceae), um arbusto nativo do Brasil, encontrado comumente no cerrado. O nome comum dado ao composto no trabalho de Borges foi chaetoviridina H. E, embora esta molécula não tenha relatos de atividade biológica na literatura, BORGES et al., 2011, aponta grande semelhança com a chaetoviridina A, que notadamente tem atividade inibidora de tumores em camundongos e mostrou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de micélios de *Pyricularia oryzae*.

Na figura 5 estão representadas as interações proteína-ligante do composto Candesartan, identificado no banco de dados ZINC como 4097427, onde é possível identificar três ligações de pontes de hidrogênio nos aminoácidos Lys1074, Trp1083 e Asn1167 e nove interações hidrofóbicas nos aminoácidos Trp1069, Leu1085, Leu1149, Leu1076, Ile1165, Thr1120, Trh1122, Gly1121 e Thr1168.

Figura 5: Interação proteína-ligante bidimensional e estrutura tridimensional apontando a posição do composto no sítio ativo da proteína.



Fonte: Organizado pelo autor

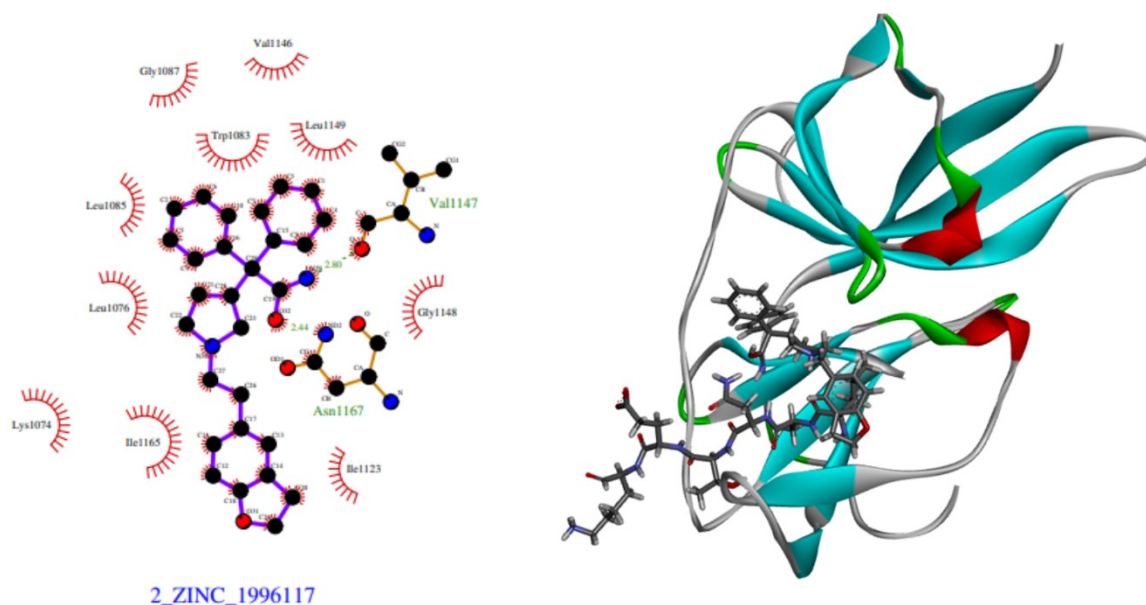
A candesartana é um derivado do tetrazol (anel heterocíclico de cinco membros com 4 átomos de nitrogênio). Clinicamente é usado na forma de Candesartan Cilexetil, um pró-fármaco que é quimicamente um éster etílico do ácido com a fórmula química C₃₃H₃₄N₆O₆.

Este medicamento é um antagonista do receptor tipo 1 da angiotensina II, causando uma reação de redução da pressão arterial e retenção de líquidos (VALENTINA et al., 2022).

O estudo de VALENTINA et al., 2022 conclui que o tratamento com candesartan foi eficaz na indução da inibição da replicação e na redução da porcentagem de infecção em um modelo de infecção secundária pelo vírus da dengue.

A figura 6 demonstra a interação proteína ligante do composto Darifenacina (ZINC ID 1996117), formando uma ligação de hidrogênio no aminoácido Val1147 e dez interações hidrofóbicas.

Figura 6: Interação proteína-ligante bidimensional e estrutura tridimensional apontando a posição do composto no sítio ativo da proteína.



Fonte: Organizado pelo autor

A darifenacina é um antagonista seletivo do receptor M3 muscarínico que foi avaliado em ensaios clínicos em pacientes com síndrome da bexiga hiperativa (OAB) usando uma formulação de liberação controlada (CROOM; KEATING, 2004).

Em estudos in silico ODHAR et al., 2021 realizaram uma triagem virtual baseada em estrutura para redirecionar medicamentos aprovados pela FDA contra a protease NS2B/NS3 do vírus Zika e relataram que o agente antimuscarínico Darifenacina pode ter capacidade potencial para inibir a protease NS2B/NS3 do vírus Zika. A droga foi capaz de manter a proximidade do sítio ativo da protease durante a simulação.

4.4 ANÁLISE DE TOXICIDADE IN SILICO

Na tabela 5 foram apresentados os resultados para o estudo farmacocinético realizado no software pkSCM.

O pkSCM usa o conceito de assinaturas estruturais baseadas em gráficos para estudar e prever uma variedade de propriedades ADMET para novos compostos químicos (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

COMPOSTO	AMES toxicity	Max. tolerated dose (human)	hERG I inhibitor	hERG II inhibitor	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	Hepatotoxicity	<i>T.Pyrifos</i> toxicity	Minnow toxicity
NuBBe_2166	No	0.656	No	Yes	1.813	No	0.46	-1.97
NuBBe_680	No	0.619	No	Yes	2.736	No	0.296	-4.841
ZINC_4097427	Yes	0.351	No	Yes	2.58	No	0.285	-1.213
ZINC_1996117	Yes	0.256	Yes	Yes	2.158	No	0.288	-0.889

Tabela 5: Estudo farmacocinético de toxicidade realizado pelo pkSCM

O teste de AMES é um método amplamente empregado para avaliar um composto com potencial mutagênico usando bactérias. Um teste positivo indica que os compostos são mutagênicos e, portanto, podem atuar como cancerígenos (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015b). Na tabela, nota-se que ambos os compostos do ZINC, a Candesartana e a Derifenacina deram positivo para potencial mutagênico, em contrapartida os compostos do NuBBe não apresentaram indicativos de atuação como cancerígenos.

A dose máxima tolerada por humanos é uma extrapolação feita por estudos em animais que indica a quantidade máxima de droga recomendada para início em ensaios clínicos, e conforme descrito por PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015b, valores menores ou iguais a 0.477 são considerados baixos e acima de 0.477 considerados altos.

Assim, para os compostos testados é possível observar que o 2166 e o 680 são classificados como altos com valores de 0.656 e 0.619, respectivamente, indicando que seria necessária uma dose mais alta dessas substâncias para causar efeitos adversos inaceitáveis. Ambos os compostos do ZINC apresentaram valores menores que 0.477.

A inibição dos canais de hERG I e II, codifica a subunidade formadora de poros dos canais de potássio, que é importante para a repolarização cardíaca. Quando é inibida

causa o desenvolvimento da síndrome do QT longo adquirido levando à arritmia ventricular fatal(PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015b)

Para hERG I apenas o composto 1996117 apresentou potencial ação inibidora e para hERG II todos os compostos deram positivo para ação inibidora, presume-se assim, que não haveria boa aceitabilidade para pacientes com problemas cardiovasculares.

Para a toxicidade em camundongos (LC50) (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015b) estabelecem que valores menores que -0.3 classificam o composto como altamente tóxico, o que não é observado em nenhuma das substâncias testadas.

A lesão hepática induzida por drogas é uma importante preocupação de segurança para o desenvolvimento de drogas (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015b). Nenhum dos compostos analisados apresentaram hepatotoxicidade conforme observado na tabela 5.

A toxicidade para *T. Pyriformis*, é comumente usado como parâmetro. Compostos que apresentam valores maiores que 0.5 ug/l são considerados tóxicos, nenhum dos compostos apresentaram toxicidade para *T. Pyriformis*.

O teste de LD50 em ratos mensura a quantidade máxima de composto aplicado que causa morte em 50% do grupo de teste em animais, ou seja, quanto maior a dose necessária, menor a toxicidade do composto. Assim, nas substancias analisadas conclui-se que os compostos 680 e 1996117 (Defiranacina) tem os maiores valores de LD50. O menor valor apresentado foi o da Candesartana.

5 CONCLUSAO

- Através de triagem virtual e docking foi possível identificar moléculas com características conformacionais e farmacocinéticas favoráveis a inibição da proteína de replicação NS2B-NS3.
- Os compostos 4097427 e 1996117 são potenciais candidatos a reposicionamento de drogas, uma vez que a Candesartana já foi relatada como inibidora de replicação do vírus da dengue e a Derifenacina apresentou atividade inibidora da protease NS2B-NS3 do vírus Zika.
- Os compostos 2166 e 680 apresentaram resultados promissores na ancoragem molecular, superiores aos compostos aprovados pela FDA do banco dos dados ZINC, porém carecem de maiores estudos de elucidação de sua atividade biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO-VIEIRA, D. F. et al. Dengue, Yellow Fever, Zika and Chikungunya epidemic arboviruses in Brazil: ultrastructural aspects. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2021.
- BORGES, W. S. et al. Azaphilones from the endophyte *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 5, p. 1182–1187, 27 maio 2011.
- CANNALIRE, R. et al. Functionalized 2,1-benzothiazine 2,2-dioxides as new inhibitors of Dengue NS5 RNA-dependent RNA polymerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1667–1676, 1 jan. 2018.
- CROOM, K. F.; KEATING, G. M. Darifenacin: In the treatment of overactive bladder. **Drugs and Aging**, v. 21, n. 13, p. 885–892, 22 set. 2004.
- DA SILVA-JÚNIOR, E. F.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 15 set. 2019.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 18 ago. 2016.
- HARTSHORN, M. J. et al. Diverse, high-quality test set for the validation of protein-ligand docking performance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 726–741, 22 fev. 2007.
- HASAN, S. et al. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**. January-February, Vol. 6, No. 1, 2016.
- HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 74–82, 1 jan. 2007.
- KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 1, p. 84–96, 2009.
- LAVECCHIA, A. et al. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review
Related papers Int egrat ion of virt ual and physical screening Eric Prossnit z Discovery of Mit ogen-Act ivat ed Prot ein Kinase-Int eract ing Kinase 1 Inhibit ors by a Comprehensive Fr... Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. **Current Medicinal Chemistry**. v. 20, 2013
- LIN, K.-H. et al. Dengue Virus NS2B/NS3 Protease Inhibitors Exploiting the Prime Side. **Journal of Virology**, v. 91, n. 10, 15 maio 2017.

LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. 1,11-diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone neolignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 751–755, 1 jan. 1982.

Molecular Filtering Software | **Filter**. Disponível em: <<https://www.eyesopen.com/filter>>. Acesso em: 21 out. 2022.

MONTEIRO, D. C. S. et al. Dengue: 30 years of cases in an endemic area. **Universidade de Sao Paulo**, 2019.

MURCKO, M. et al. Virtual screening- an overview. **Drug Discovery Today**. Vol. 3, 1 abril, Pages 160-178, 1998.

ODHAR, H. et al. Computational Screening of FDA Approved Drugs from ZINC Database for Potential Inhibitors of Zika Virus NS2B/NS3 Protease: A Molecular Docking and. **alzahu.edu.iq**, v. 33, n. 39B, p. 308–319, 2021.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 14 maio 2015a.

RUT, W. et al. Profiling of flaviviral NS2B-NS3 protease specificity provides a structural basis for the development of selective chemical tools that differentiate Dengue from Zika and West Nile viruses. **Antiviral Research**, v. 175, 1 mar. 2020.

SOUZA, R.; VALLE, S.; REIS. Avaliação In Silico de fármacos comerciais para reposicionamento na terapêutica da tuberculose. **Universidade de Brasília – Faculdade de Ciências da Saúde**. 2020.

TUCCINARDI, T. et al. Protein kinases: Docking and homology modeling reliability. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 8, p. 1432–1441, 23 ago. 2010.

Ucuúba-do-Cerrado: Virola sebifera. - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1140268/ucuuba-do-cerrado-virola-sebifera>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

VALENTINA, L. et al. Análisis del efecto del Candesartán en la replicación in vitro del virus dengue en un modelo de potenciación de la infección mediado por anticuerpos. **Universidad El Bosque**. 2022.

VENHORST, J. et al. Assessment of scaffold hopping efficiency by use of molecular interaction fingerprints. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3222–3229, 12 jun. 2008.

VERDONK, M. L. et al. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. **Proteins**. Vol. 52, p. 609-623, 1 ago, 2003

WU, H. et al. Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1100–1109, 1 fev. 2015

YAO, Y. et al. Discovery, X-ray Crystallography and Antiviral Activity of Allosteric Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 17, p. 6832–6836, 1 maio 2019.