

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

DOMINIC ALEXANDER WÜRZNER

TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS DISRUPTORES DO PROCESSO DE
REPLICAÇÃO E INFEÇÃO PELO VÍRUS DE MARBURG

UBERLÂNDIA - MG
NOVEMBRO DE 2024

DOMINIC ALEXANDER WÜRZNER

TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS DISRUPTORES DO PROCESSO DE
REPLICAÇÃO E INFECÇÃO PELO VÍRUS DE MARBURG

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

UBERLÂNDIA

2024

DOMINIC ALEXANDER WÜRZNER

Triagem virtual de potenciais disruptores do processo de replicação e infecção pelo vírus de Marburg

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior - IBTEC
Presidente

Danilo Caixeta Moreira - IBTEC
Membro

José Augusto Leoncio Gomide - IBTEC
Membro

“Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, Minas Gerais, 21 de novembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, avós, irmão e namorada, por me apoiarem, serem pacientes comigo e me aconselharem em momentos de necessidade.

Às amigas que cultivei ao longo da vida que me ajudaram a chegar onde estou e que me influenciaram a ser quem eu sou.

Aos professores que me fizeram ser curiosos e querer buscar explicações para as minhas várias perguntas. Em especial agradeço ao professor Nilson, que aceitou me orientar na elaboração deste trabalho e foi de grande ajuda.

E por último agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e ao meu tempo como estudante, por me permitirem um enorme desenvolvimento, como indivíduo, profissional e cientista.

RESUMO

A Doença Viral de Marburg é uma enfermidade de alta preocupação global, especialmente devido à sua alta letalidade. A infecção inicial por esse vírus ocorre pelo contato direto ou indireto com morcegos da espécie *Rousettus aegyptiacus* ou o contato com outros animais infectados, como manuseio e ingestão de carnes de animais selvagens. Uma vez estabelecida, a infecção pode rapidamente evoluir para quadros graves com sintomas como hemorragias, falência de órgãos, sintomas neurológicos e até mesmo óbito em poucos dias. Também há uma maior facilidade de transmissão entre pessoas, que se dá pelo contato direto com fluidos corporais contaminados. Atualmente as únicas formas de controlar a disseminação da doença ou de tratar os infectados é através de cuidados paliativos, sanitização adequada e conscientização populacional, uma vez que não há tratamentos ou vacinas disponíveis. Considerando as limitações derivadas da alta letalidade e periculosidade do vírus, o design de drogas auxiliado por computadores se mostra como uma interessante ferramenta na pesquisa e desenvolvimento de fármacos para seu tratamento. Esse estudo buscou prospectar diversos compostos de origem natural encontrados em duas bibliotecas online, NuBBE e MolPort e observar sua interação com a nucleoproteína (NP) do vírus de Marburg. Essa proteína está associada com a replicação e formação viral e, desta forma, compostos que poderiam alterar o seu funcionamento podem se tornar potenciais fármacos para perturbar a proliferação viral, retardar o desenvolvimento da doença e melhorar o prognóstico de pessoas infectadas. Foram encontradas duas moléculas do banco de dados MolPort (códigos 89152 e 5701) com potencial inibitório, uma vez que apresentaram potencial interação com a NP além de características toxicológicas e cinéticas favoráveis. Esses compostos poderão ser testados em futuros sistemas biológicos para avaliar sua atuação na infecção pelo vírus de Marburg ou funcionar como base para o desenvolvimento de outros compostos com características farmacológicas mais interessantes. Além disso, a utilização da nucleoproteína como alvo é uma promissora via no enfrentamento a vírus de RNA de fita simples negativa, considerando que essa é uma proteína comum entre vírus desse grupo e com importante atividade no ciclo infeccioso viral e esse estudo pode futuramente consolidar essa frente de pesquisa.

Palavras-chave: nucleoproteína; doença viral de Marburg; febre hemorrágica de Marburg; antiviral; MARV.

ABSTRACT

Marburg virus disease is a disease that especially due to its high mortality rate poses a high threat to global sanitary security. The infection is initially dependent on direct or indirect contact with *Rousettus aegyptiacus* bats or contact with other infected animals, like handling or consumption of bushmeat. Once established the disease may rapidly evolve to more severe conditions with symptoms like hemorrhage, organ failure, and neurological symptoms and even leading to death within a few days after infection and facilitating the spreading between humans through contaminated bodily fluids. Nowadays supportive care, adequate hygiene and increasing awareness are the only ways to control spreading and treating the infected, since there are no available treatments or vaccines. Considering the limitations due to the virus' high lethality and the danger associated with its research, computer aided drug design becomes an interesting tool for research and development of drugs for its treatment. Computer aided drug design becomes an interesting tool especially for diseases like Marburg virus disease, where the high risk associated with biological systems becomes a significant roadblock. The aim of this study was to evaluate a plethora of natural compounds from two databases, NuBBE and MolPort and their interaction with the Marburg virus' nucleoprotein (NP). This protein is associated with viral replication and construction and molecules that could alter the protein's proper function could disturb viral proliferation, postpone the disease's development and improve prognosis. Two molecules were found within MolPort database (codes 89152 and 5701 in this study) with promising inhibitory potential due to their capabilities of possibly interacting with NP and their favorable toxicological and kinetic properties. These compounds could be further tested in biological systems to assess their role in Marburg virus infection or to be used as building blocks for other compounds to be developed with better pharmacological properties. Furthermore, the use of nucleoproteins as targets is a promising frontier in drug design against negative single stranded RNA viruses considering it is a common protein between virus of this group and its activity in the viral infectious cycle and this study could further consolidate its importance.

Keywords: nucleoprotein; Marburgvirus disease; Marburg hemorrhagic fever; antiviral; MARV.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CADD	<i>Computer Aided Drug Design</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DVE	Doença Viral do Ebola
DVM	Doença Viral de Marburg
EBOV	<i>Ebola Virus</i>
GP	Glicoproteína
L	<i>Large protein</i>
MARV	<i>Marburg Virus</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
NP	Nucleoproteína
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RNP	Ribonucleoproteína
VP	<i>Virus protein</i>

SUMÁRIO

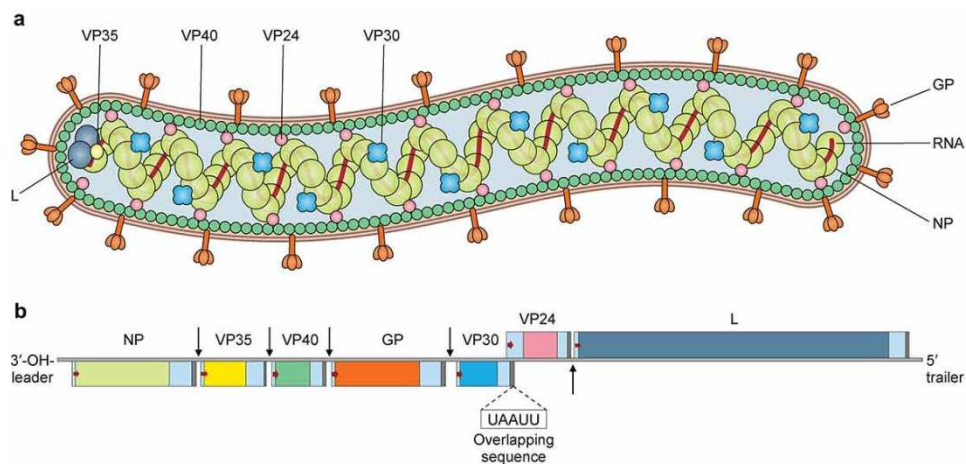
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo Geral.....	13
3.2. Objetivos Específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Construção do modelo baseado em forma.....	13
4.2. Preparação do banco de dados	14
4.3. Triagem e ancoragem.....	14
4.4. Análise de propriedades químicas e físico-químicas <i>in silico</i>	15
4.5. Visualização de interação proteína-ligante	15
5. RESULTADOS	15
5.1. Geração de modelo baseado em forma	16
5.2. Triagem e ancoragem das bibliotecas de compostos	17
5.3. Avaliação de toxicidade e de propriedades físico-químicas das moléculas	17
5.4. Geração de diagramas 2D e de imagens 3D para visualização da interação NP-ligante	18
6. DISCUSSÃO.....	20
6.1. Os compostos habitaram duas regiões principais na nucleoproteína viral	22
7. CONCLUSÃO.....	23
8. REFERÊNCIAS	25
APÊNDICE A – VISUALIZAÇÕES BI- E TRIDIMENSIONAIS DAS MOLÉCULAS SELECIONADAS EM RELAÇÃO À NUCLEOPROTEÍNA VIRAL.....	29

1. INTRODUÇÃO

A família *Filoviridae* é uma família viral de grande importância sanitária global por conter vírus causadores de doenças hemorrágicas virais (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2023). Dois gêneros de maior preocupação são *Orthoebolavirus* e *Orthomarburgvirus*, sendo que o último engloba os vírus Ravn e Marburg, ambos causadores da doença viral de Marburg (BIEDENKOPF *et al.*, 2024).

O vírus de Marburg (MARV) é um vírus de RNA de fita simples negativa não segmentada e seu material genético codifica sete proteínas, sendo elas, em ordem: 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5' (Figura 1). Possuem um formato filamentosso, com um diâmetro uniforme e comprimento variável (Figura 2), sendo compostos de um núcleo central ribonucleoproteico envolto por uma matriz e um envelope lipídico (BIEDENKOPF *et al.*, 2024). A infecção ocorre inicialmente pela interação da proteína GP com proteínas da superfície celular e posterior endocitose. Uma vez no endossomo, a clivagem da GP permite sua ligação com a proteína Niemann Pick C1 e a fusão das membranas endossomal e viral, permitindo a liberação do nucleocapsídeo para o citoplasma celular. Inicialmente há produção de proteínas por meio da maquinaria celular e a subsequente formação de corpúsculos de inclusão, locais em que ocorre a transcrição, replicação e formação de nucleocapsídeos. Os vírions são posteriormente transportados à membrana, onde ocorre o brotamento e sua liberação no organismo (HUME; MÜHLBERGER, 2019).

Figura 1 - Estrutura morfológica e genética do vírus de Marburg.



Fonte: ABIR *et al.*, 2022.

Figura 2 - Microscopia eletrônica de partículas virais do vírus de Marburg (vermelho) em brotamento de células Vero E6 de *Chlorocebus aethiops* (Linnaeus, 1758).

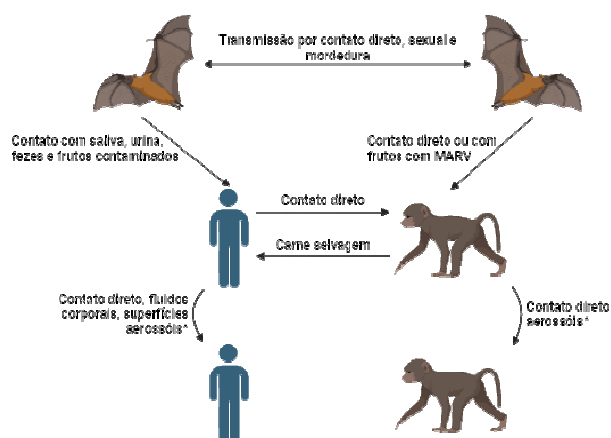


Fonte: BIEDENKOPF *et al.*, 2024

A nucleoproteína (NP) é uma proteína que se associa ao RNA viral, além de ser uma proteína estrutural parcialmente responsável pela formação do nucleocapsídeo viral, de corpúsculos de inclusão e por auxiliar na replicação e transcrição do genoma viral (BIEDENKOPF *et al.*, 2024). Além disso, a complexação do RNA com a NP possui diversas funções para o vírus uma vez dentro da célula hospedeira, como escape do sistema imune inato da célula (e resistência a ribonucleases) e redução do acúmulo de RNA de fita dupla (que levaria à ativação do sistema imune celular) (HUR, 2019). No entanto, normalmente a proteína viral 35 (VP35) pode se ligar à NP, temporariamente desligando o RNA da proteína, mas esse complexo (VP35-NP) parece também ser necessário para a replicação do genoma viral pela RNA-polimerase-RNA-dependente (RdRp) (LIU *et al.*, 2017).

A DVM, antes denominada de doença hemorrágica de Marburg devido à possibilidade de aparecimento de hemorragias em pacientes em estágio avançado é uma doença que pode alcançar uma alta letalidade, sendo que alguns surtos alcançaram letalidade entre 80 e 90% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021). É uma doença zoonótica, com fortes evidências sugerindo que o morcego frugívoro *Rousettus aegyptiacus* é o reservatório natural do MARV podendo a proximidade e o contato com estes ou com frutas contaminadas ser importantes fontes de contaminação humana (ABIR *et al.*, 2022). No entanto, acredita-se que outros morcegos possam também atuar como vetores, bem como animais selvagens contaminados, estejam estes vivos ou mortos, este último através do contato com a carne contaminada (Figura 3) (SRIVASTAVA, SHRIYANSH *et al.*, 2023).

Figura 3 - Vias de infecção humana e animal pelo vírus de Marburg.



Fonte: SRIVASTAVA, SHRIYANSH *et al.*, 2023, adaptado.

Uma vez infectado, o período de incubação da doença pode variar entre dois e 21 dias (comumente dura cinco dias), período no qual não há transmissão (AFRICACDC, [S.d.]; SRIVASTAVA, DEVANG *et al.*, 2023). Após o estabelecimento da doença, a transmissão pode ocorrer por meio do contato direto de mucosas ou lesões na pele com fluidos corporais com alta carga viral de uma pessoa infectada, exigindo contato muito próximo com a pessoa, tornando profissionais da saúde especialmente vulneráveis (AFRICACDC, [S.d.]). Além disso, a transmissão por fômites contaminados também deve ser considerada, especialmente pelo longo tempo de vida de partículas virais em líquidos, vidro e plásticos em temperaturas baixas (até três semanas para vidro e plásticos). A transmissão através de aerossóis, apesar de ter sido demonstrada experimentalmente em animais ainda não foi verificada em surtos com humanos, mas é provavelmente possível (MITU; ISLAM, 2024). Por último, há um aumento recente na preocupação com a transmissão de filovírus por meio de contato sexual, uma vez que carga viral foi identificada no sêmen de homens até 200 dias após o estabelecimento da infecção, justificando as recomendações da OMS sobre abstinência ou utilização de preservativos por pelo menos 12 meses após infecção ou até que dois testes consecutivos distantes pelo menos uma semana um do outro tenham resultado negativo (KARAMI; LETAFATI; FAKHR, 2024; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021).

A DVM pode clinicamente ser dividida em três fases, sendo elas a fase de generalização (primeira), fase precoce de órgãos (segunda) e fase tardia de órgãos/de recuperação (terceira) (SRIVASTAVA, SHRIYANSH *et al.*, 2023). Na fase inicial os sintomas da doença são não específicos, podendo incluir febre alta, calafrios, dores de cabeça e muscular, mal-estar, perda de apetite, faringite e conjuntivite, mas podem evoluir rapidamente para quadros mais sérios. Na fase precoce de órgãos há o possível aparecimento

de náusea, vômito, dores no peito, na garganta e abdominal, diarreia e exantema maculopapular e até mesmo sintomas neurológicos como perda de orientação, irritabilidade, psicose e até mesmo agressividade. É possível ainda que o quadro evolua para casos severos, em que os sintomas podem incluir icterícia, insuficiência hepática, hemorragia, choque hipovolêmico e disfunção múltipla de órgãos, sendo os dois últimos as principais causas de morte. Casos não letais da doença podem levar ao aparecimento de anomalias metabólicas agudas, convulsões e desidratação severa (AFRICACDC, [S.d.]; SRIVASTAVA, SHRIYANSH *et al.*, 2023).

Devido à falta de fármacos e vacinas liberadas para o tratamento e a prevenção da DVM, a limitação de surtos se baseia majoritariamente no enterro adequado e seguro de falecidos, rastreamento e monitoramento de contatos, rápida detecção de casos e isolamento, conscientização populacional, cuidados paliativos (hidratação, amenização da dor e controle de infecções secundárias) e práticas adequadas de sanitização e higiene (MITU; ISLAM, 2024; SRIVASTAVA, DEVANG *et al.*, 2023; SRIVASTAVA, SHRIYANSH *et al.*, 2023).

Desde 2020, cinco surtos da doença ocorreram, sendo eles em Ruanda em setembro de 2024, Tanzânia e Guiné Equatorial, respectivamente, em junho e fevereiro de 2023, Gana em julho de 2022 e novamente Guiné Equatorial em 2021, com 63 fatalidades de 120 casos confirmados (52,5% de taxa de mortalidade entre os surtos mencionados) (RWANDA BIOMEDICAL CENTRE, 2024; SRIVASTAVA, DEVANG *et al.*, 2023). Surtos da DVM são frequentemente rurais, severos e caóticos e, por consequência, pode haver problemas de subnotificação, como já observado com o vírus Ebola (EBOV), que demonstrou a presença de anticorpos entre 5% e 15% da população analisada, valor muito maior de infecções do que aquelas já registradas oficialmente (MACNEIL; ROLLIN, 2012).

As características acima mencionadas dos surtos, bem como a evolução rápida, potencial transmissão para profissionais da saúde despreparados e altas taxas de mortalidade podem também reduzir de forma significativa a produção e o acesso a dados relativos ao surto e à doença, desde informações relacionadas à patologia quanto aos dados de laboratório, dificultando o avanço técnico-científico seu combate, bem como limitar o estudo de eficácia de vacinas e fármacos nos âmbitos éticos e logísticos (SHIFFLETT; MARZI, 2019). Desta forma, é justificada a classificação da DVM como uma doença negligenciada, título que se dá pelo menor investimento, menor atenção e reduzida pesquisa quando comparada com outras doenças infecciosas. Ademais, as faltas de incentivos econômicos para o desenvolvimento de fármacos e investimentos restritos no desenvolvimento de vacinas prejudicam o progresso nessas linhas (SRIVASTAVA, DEVANG *et al.*, 2023).

Outra considerável dificuldade técnica para o estudo da DVM e de fármacos e vacinas que poderiam ser utilizados é a dificuldade quanto a animais modelos que podem ser utilizados. Primatas não humanos são, atualmente, os animais que melhor conseguem replicar os sintomas da DVM, porém questões éticas, altos custos relacionados com sua manutenção e obtenção dificultam sua utilização em testes clínicos. Outros modelos animais como camundongos, hamsters e porquinhos-da-índia também já foram experimentalmente usados, mas são mais limitadas em relação à incapacidade de mimetizar todos os sintomas presentes em humanos ou de depender de vírus adaptados (SHIFFLETT; MARZI, 2019).

O estudo da DVM e da doença do vírus Ebola (DVB), bem como a busca de tratamentos e vacinas para ambas é de grande interesse mundial, dada a alta letalidade de ambas. São doenças consideradas de alta periculosidade, sendo considerados de grupo de risco 4 de biossegurança pelos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos (NIH)(MEECHAN *et al.*, 2020). O MARV e o vírus Ebola são considerados agentes seletos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estadunidense, isto é, são aqueles que apresentam potencial de serem graves ameaças à saúde humana, animal e de plantas ou a produtos de origem animais e vegetais (FEDERAL SELECT AGENTS PROGRAM; DIVISION OF REGULATORY SCIENCE AND COMPLIANCE, 2024). Dentro da classe dos agentes seletos, são ainda considerados de nível 1, que são descritos pelo CDC como agentes que apresentam o maior risco de serem utilizados de forma indevida e deliberada, com potencial significativo para causar casualidades em massa ou gerar efeitos devastadores na economia, em infraestruturas críticas ou na confiança pública, e que são graves ameaças à saúde pública e segurança (FEDERAL SELECT AGENTS PROGRAM; DIVISION OF REGULATORY SCIENCE AND COMPLIANCE, 2020).

Perante as dificuldades acima mencionadas, um complemento para a pesquisa de fármacos é o *design* de drogas assistido por computadores (CADD, do inglês *Computer Aided Drug Design*). O CADD tem se tornado uma importante ferramenta no desenvolvimento farmacêutico, uma vez que permite uma maior eficiência em relação à utilização dos recursos disponíveis e, por consequência, uma potencial redução no tempo necessário para a produção de medicamentos, bem como permite avaliar propriedades farmacocinéticas. O CADD utiliza duas vias principais para a avaliação dos compostos, baseado em estrutura e baseado em ligante. A primeira é utilizada quando a estrutura da proteína-alvo é conhecida, enquanto a segunda é utilizada quando a proteína-alvo é desconhecida, mas se tem a estrutura de ligantes que conseguem se ligar a ela (PADOLE *et al.*, 2022). A triagem virtual por sua vez é um aprofundamento de ambas as técnicas e permite avaliar uma grande quantidade de compostos

e avaliar se eles são semelhantes ao ligante anteriormente determinado ou se possuem características favoráveis ao encaixe à proteína-alvo. Outra ferramenta interessante no CADD é a construção de modelos farmacofóricos, que são estruturas tridimensionais que apresentam características estéricas e eletrônicas semelhantes ao ligante, permitindo a seleção inicial de moléculas que se assemelham o suficiente ao farmacóforo proposto (BAIG *et al.*, 2018). O CADD se mostra como uma interessante ferramenta para avaliação rápida de compostos que poderiam potencialmente se tornar fármacos. Isso é especialmente interessante no caso da DVM, uma doença cujo desenvolvimento de fármacos é fortemente restringido por questões éticas relacionadas às naturezas do surto, limitações financeiras e dificuldades em relação à utilização de animais modelo (MACNEIL; ROLLIN, 2012; SHIFFLETT; MARZI, 2019; SRIVASTAVA, DEVANG *et al.*, 2023).

Levando em consideração o acima mencionado, a DVM é uma doença de grande importância para a segurança sanitária global, porém seu estudo e o desenvolvimento de fármacos e vacinas sofrem com falta de financiamento e atenção quando comparado a outras doenças. O CADD é uma interessante forma de avaliar o funcionamento de compostos sobre macromoléculas sem envolver testes biológicos, inteiramente *in silico*, se mostrando uma ferramenta de fundamental importância no caso da DVM, uma doença que pode rapidamente levar a pessoa acometida a um estado grave e até mesmo a morte. A NP por sua vez se trata de um interessante alvo para a prospecção de fármacos pela sua importância na formação e replicação viral. Os resultados desse trabalho podem dar uma nova luz a potenciais alvos do MARV e auxiliar no desenvolvimento de fármacos, em consonância com o terceiro Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas, buscando promover saúde e bem-estar da população.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando os recentes surtos da DVM, a sua caracterização como doença negligenciada, as dificuldades associadas ao desenvolvimento de fármacos para essa doença, a inexistência de medicamentos liberados para seu tratamento e pelo alto risco que essa doença representa esse trabalho busca encontrar potenciais compostos que possam ser utilizados em seu tratamento por meio da triagem *in silico* de compostos e a avaliação da sua interação com a NP viral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo a busca de compostos de origem natural ou derivados de bancos de dados que poderiam ter função antiviral para posterior utilização como fármacos para controle da DVM.

3.2. Objetivos Específicos

- Construir um modelo baseado em forma a partir do peptídeo VP35, extraído do complexo com a NP do MARV, disponível no banco de dados PDB.
- Observar as interações entre a NP e as moléculas avaliadas a partir da ancoragem molecular.
- Analisar, *in silico*, as propriedades farmacocinéticas dos compostos selecionados.
- Selecionar potenciais ligantes à NP de MARV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Construção do modelo baseado em forma

Para construir o modelo utilizado na triagem de moléculas foi utilizado o programa vROCS 3.2.1.4 (*OpenEye, Cadence Molecular Sciences, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>*) (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007). A proteína utilizada como alvo foi a NP do MARV e foi obtida a partir de um complexo proteico em que esta proteína se encontra complexada com o peptídeo viral VP35. A VP35 por sua vez foi utilizada para a construção do modelo farmacofórico, também no *software* vROCS. No entanto, o peptídeo inicialmente gerou um modelo extremamente complexo e que dificultaria encontrar compostos que poderiam se ligar à NP. Assim, alguns pontos farmacofóricos como

doadores e aceptores de elétrons, bem como pontos semelhantes em sobreposição foram removidos. O complexo foi obtido por Liu e colaboradores por cristalografia e está disponível no *Protein Data Bank* (PDB) com o código de identificação 5F5O.

4.2. Preparação do banco de dados

A partir do modelo preparado anteriormente, moléculas de duas bases de dados de compostos orgânicos foram avaliados. A primeira é uma base de dados brasileira denominado Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE, <http://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbedb.html>), que compreende diversas moléculas derivadas de produtos naturais existentes no território nacional (PILON *et al.*, 2017). O segundo banco de moléculas utilizado foi o MolPort (<https://www.molport.com/shop/index>), uma base comercial que contém diversos compostos orgânicos, sejam eles produtos naturais ou similares de produtos naturais.

Após obtenção das moléculas, as bibliotecas de compostos foram processadas pelo programa FILTER do OMEGA 2.5.1.4, (*OpenEye, Cadence Molecular Sciences*, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>) (HAWKINS *et al.*, 2010). Esse programa filtra compostos que poderiam ser potencialmente indesejáveis, como compostos tóxicos ou com alta capacidade de formação de ligações covalentes com o alvo.

A seguir, os compostos foram processados pelo programa QUACPAC 1.6.3.1, (*OpenEye, Cadence Molecular Sciences*, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>). Este, por sua vez, enumera o pKa das moléculas inseridas buscando obter compostos que são compatíveis com o pH do sangue, bem como compostos com a protonação adequada.

Por fim, os compostos foram processados pelo OMEGA (HAWKINS *et al.*, 2010), que permite a geração de confôrmeros bioativos com rapidez e confiabilidade.

4.3. Triagem e ancoragem

Para realizar a triagem das moléculas foi utilizado o programa ROCS 3.2.1.4 (*OpenEye, Cadence Molecular Sciences*, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>) (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007). Esse programa faz uso de uma técnica baseada no ligante, em que um modelo farmacofórico é produzido a partir de uma molécula base (nesse trabalho foi utilizada a VP35). As moléculas são então comparadas com esse

modelo e atribuídas uma pontuação (*TanimotoCombo*), que reflete a semelhança conformacional, de cargas e de polaridade.

A ancoragem por sua vez busca encontrar os melhores encaixes das moléculas com a NP. As 500 melhores moléculas obtidas após a triagem foram utilizadas para fazer a ancoragem e tal processo foi feito pelo programa GOLD, um programa que usa um algoritmo genético para prever a ligação dos compostos testados com o sítio determinado da proteína alvo (JONES *et al.*, 1997). De forma semelhante, as moléculas são atribuídas uma pontuação denominada CHEMPLP e destas, as cinco mais bem pontuadas de cada base de dados foram selecionadas.

4.4. Análise de propriedades químicas e físico-químicas *in silico*

As dez moléculas anteriormente obtidas foram posteriormente analisadas com auxílio de duas plataformas de análises de compostos drug-like online, sendo elas pkCSM e PlayMolecule, especificamente as ferramentas de determinação de toxicidade e afinidade de ligação com a proteína alvo (KDeep), respectivamente (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015; TORRENS-FONTANALS *et al.*, 2024). A avaliação dessas características *in silico* se mostra interessante, pois permite prever se os compostos avaliados se encaixam nos parâmetros necessários para a produção de medicamentos ou para reduzir a quantidade de testes *in vivo* que viriam ser necessários para avaliar o potencial fármaco.

4.5. Visualização de interação proteína-ligante

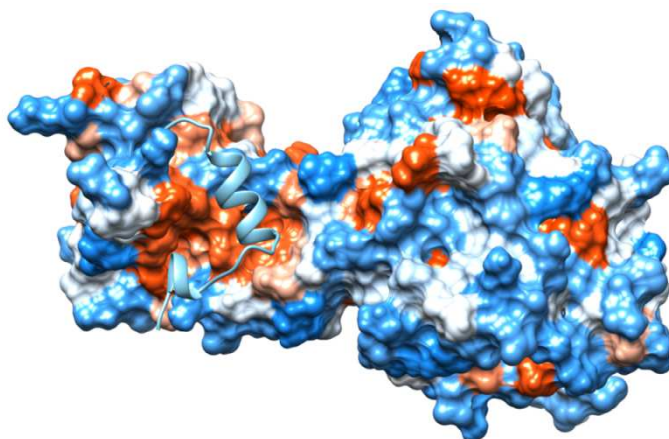
Por fim, foram feitas visualizações das interações entre a proteína e as moléculas, buscando um melhor esclarecimento de como ocorre. Diagramas de ligação bidimensionais entre a proteína-alvo e os compostos obtidos anteriormente foram feitos através do programa LigPlot⁺, permitindo a análise das regiões proteicas que estão relacionadas com essa interação (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Além disso, foram também feitas imagens tridimensionais que mostram, no espaço, o posicionamento dos compostos testados em relação à proteína através do programa VIDA (*OpenEye, Cadence Molecular Sciences*, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>).

5. RESULTADOS

5.1. Geração de modelo baseado em forma

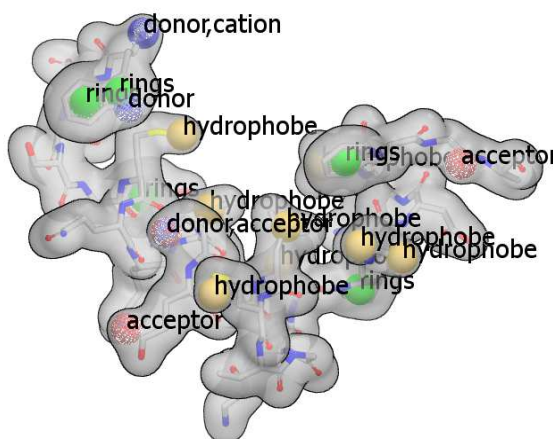
Para construção do modelo baseado em forma foi utilizado o peptídeo inibidor VP35 do complexo NP-VP35 do MARV (Figura 4) com auxílio do programa vROCS 3.2.1.4. Esse modelo (Figura 5) foi utilizado como molde para a seleção dos compostos dos bancos de dados e a proteína foi utilizada como alvo de ancoragem. A maior parte dos pontos farmacofóricos observados da VP35 são interações hidrofóbicas, justificando também sua localização na NP (Figura 4) no interior de um “bolsão” hidrofóbico.

Figura 4 - Complexo formado entre a nucleoproteína e a proteína viral 35 (visualização em fita, em azul claro) do Vírus de Marburg. Regiões em vermelho indicam aminoácidos com resíduos hidrofóbicos e azuis indicam regiões com aminoácidos hidrofílicos. Disponível no *Protein Data Bank* sob o código 5F5O.



Fonte: do autor.

Figura 5 - Modelo baseado em forma gerado através do peptídeo viral 35



Fonte: do autor.

5.2. Triagem e ancoragem das bibliotecas de compostos

No total foram triados 67.394 compostos, sendo 2223 do NuBBE e os demais foram obtidos da base de moléculas MolPort. As 1000 melhores moléculas (500 de cada base de dados) obtidas pelo vROCS (*score TanimotoCombo*) foram analisadas pelo GOLD (*score ChemPLP*), do qual os 10 compostos (5 de cada base) com a melhor pontuação de *docking* foram selecionados. Os códigos das moléculas obtidas, bem como as pontuações obtidas em cada programa estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Pontuações *TanimotoCombo* e *ChemPLP* dos compostos selecionados dos bancos de dados NuBBE e MolPort. As moléculas estão ranqueadas de acordo com sua pontuação *ChemPLP*.

Ranking	Código	<i>Tanimoto Combo</i>	<i>ChemPLP</i>
NuBBE			
1º	978	0,193	78,8365
2º	1479	0,196	77,7288
3º	2329	0,228	77,0519
4º	976	0,196	76,8516
5º	310	0,201	74,9760
MolPort			
1º	97054	0,241	85,3071
2º	89152	0,236	84,2915
3º	5701	0,249	83,6467
4º	18828	0,240	83,3628
5º	83104	0,241	83,1058

Fonte: do autor.

5.3. Avaliação de toxicidade e de propriedades físico-químicas das moléculas

As moléculas obtidas foram também avaliadas em relação à sua toxicidade e em relação a características da ligação dentre o composto e a proteína-alvo. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Na tabela 3 é fornecido o valor de pKd (log[Kd]) da VP35 para motivos de comparação, como determinado por Liu e colaboradores (2017), bem como seu peso molecular e a quantidade de átomos pesados.

Tabela 2 - Análise de toxicidade de acordo com o software online pkCSM. DMTR: dose máxima tolerada recomendada, dada em log(mg/kg/dia).

Ranking GOLD	Código	Toxicidade AMES	Hepatotoxicidade	Inibidor		DMTR - humanos
				hERG I	hERG II	
NuBBE						
1º	978	Não	Sim	Não	Sim	0.604
2º	1479	Não	Não	Não	Sim	0.525
3º	2329	Não	Não	Não	Sim	0.27
4º	976	Não	Sim	Não	Sim	0.695
5º	310	Não	Não	Não	Sim	-0.633
MolPort						
1º	97054	Não	Sim	Não	Sim	0.49
2º	89152	Não	Sim	Não	Não	-0.042
3º	5701	Não	Sim	Não	Não	0.441
4º	18828	Não	Não	Não	Sim	-0.403
5º	83104	Não	Sim	Não	Sim	-0.59

Fonte: do autor.

Tabela 3 - Avaliação da variação de energia livre de Gibbs e da constante de dissociação entre as moléculas selecionadas e a proteína alvo e tamanho molecular.

Ranking GOLD	Código	dG (kcal/mol)	pKd	Peso molecular (g/mol)	Átomos pesados
-	VP35	-	6,7905	-	-
NuBBE					
1º	978	-8,9562	6,6342	435,564	32
2º	1479	-8,4519	6,2607	419,565	31
3º	2329	-9,1298	6,7628	440,536	32
4º	976	-8,0757	5,9820	377,528	28
5º	310	-9,7913	7,2528	444,636	32
MolPort					
1º	97054	-11,778	8,7244	722,867	53
2º	89152	-10,2993	7,6291	684,790	40
3º	5701	-10,8071	8,0053	593,656	44
4º	18828	-10,0787	7,4657	500,699	36
5º	83104	-10,0274	7,4277	671,815	49

Fonte: do autor, com pKd da VP35 como observada por Liu e outros (2017).

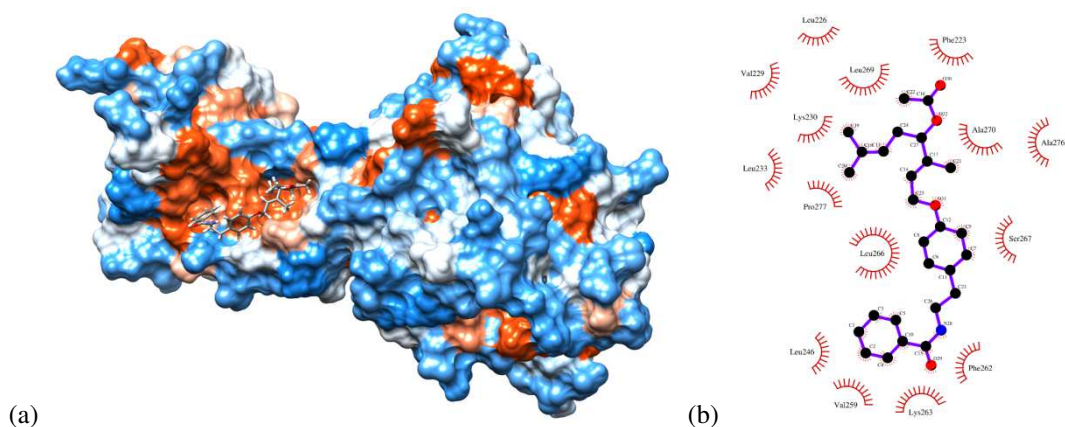
5.4. Geração de diagramas 2D e de imagens 3D para visualização da interação NP-ligante

Através do LigPlot+ foi possível observar e determinar como ocorre a interação proteína-ligante das moléculas selecionadas. Nas Figura 6b e 7b, interações hidrofóbicas entre os aminoácidos e o composto são representadas por arcos em vermelho e ligações de hidrogênio são representadas por linhas tracejadas em verde. A estrutura em roxo é o

composto em si, enquanto estruturas em marrom são aminoácidos da NP. Já as imagens tridimensionais geradas pelo VIDA permitem visualizar o posicionamento e a orientação dos compostos em relação à proteína alvo. Regiões em vermelho indicam aminoácidos com resíduos hidrofóbicos e azuis indicam regiões com aminoácidos hidrofílicos.

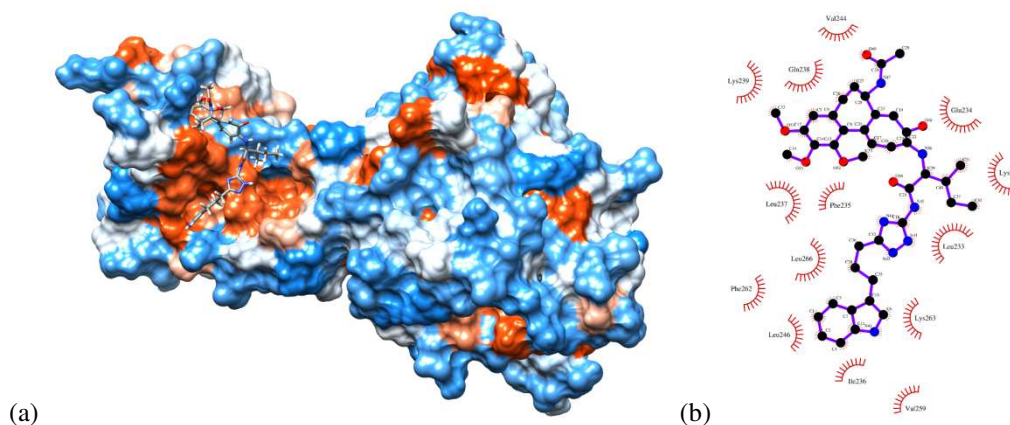
As figuras 6 são referentes à molécula de código 978 do NuBBE e as figuras 7 referentes à de código 97054 do MolPort. As moléculas do banco NuBBE apresentaram posicionamentos semelhantes entre si, com exceção do composto de código 2329. Os compostos encontrados do MolPort se encontram parcialmente em regiões inabitadas pelas moléculas do NuBBE, excetuando o composto 18828, que possui posicionamento semelhante àquelas do último. A Tabela 4 compila os aminoácidos com que cada composto anteriormente selecionado possui interação. Essas interações foram extraídas dos diagramas gerados pelo programa LigPlot+.

Figura 6 – (a) Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-978. (b) Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-978.



Fonte: do autor.

Figura 7 - (a) Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto MolPort-97054. (b) Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto MolPort-97054.



Fonte: do autor.

Tabela 4 - Interações entre os compostos selecionados nos bancos de dados e os aminoácidos da proteína alvo. Células preenchidas por X indicam que o composto interage com o aminoácido da linha correspondente. Aqueles destacados com * indicam interações hidrofílicas. Informações obtidas através do programa LigPlot+.

Aminoácido	MolPort					NuBBE				
	97054	89152	5701	18828	83104	978	1479	2329	976	310
Val201	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
Arg222	-	X*	-	-	X	-	-	X*	-	X*
Phe223	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X
Leu226	-	-	-	X	-	-	X	X	X	-
Val229	-	-	-	X	-	X	X	-	-	-
Lys230	X	X	-	X	X	X	X	X	X	-
Leu233	X	-	-	X	X	X	X	X	X	-
Glu234	X	X	X	-	X	-	-	-	-	-
Phe235	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-
Ile236	X	-	X	-	-	X	X	-	X	X
Leu237	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-
Gln238	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-
Lys239	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-
Val244	X	-	X	X	X	-	-	-	-	-
Leu246	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X
Leu259	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X
Phe262	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X
Lys263	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X
Leu266	X	-	-	X	-	X	X	-	X	X
Ser267	-	-	-	X	-	X	X	-	X	X
Leu269	-	X	-	X	-	X	X	X	X	X
Ala270	-	X	-	X	-	X	X	X	X	X
Gly273	-	-	-	-	X	-	-	X	X	-
Glu274	-	-	-	-	X	-	-	X*	-	-
Ala276	-	X	-	-	-	X	X	X	X	X
Pro277	-	X	-	-	X	X	X	X	-	X
Phe278	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
Leu298	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
Val305	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-
His309	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: do autor

6. DISCUSSÃO

Entre os 67.394 compostos testados, 10 foram selecionados de acordo com sua afinidade de ligação com a nucleoproteína do vírus de Marburg e posteriormente analisados em relação às suas propriedades toxicológicas e cinéticas em relação à ligação com a proteína alvo. Todos os compostos selecionados apresentaram uma pontuação *TanimotoCombo* relativamente baixa, considerando que pode variar entre 0 e 2, sendo que valores mais altos representam uma maior similaridade (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007). No

geral, os compostos da base de dados MolPort tiveram pontuações levemente maiores do que as obtidas da base de dados NuBBE. É possível que isso seja derivado das diferenças de tamanhos das moléculas, sendo os compostos do MolPort, em média, maiores e mais hidrofóbicos, aumentando sua afinidade com a NP e maior semelhança com a VP35, por isso aumentando sua pontuação.

Os compostos de maior pontuação no *docking* (NuBBE-978 e MolPort-97054) não possuem literatura acerca de estudos que busquem elucidar suas funções específicas. No entanto, o composto do NuBBE foi extraído de folhas de *Swinglea glutinosa*, uma planta pertencente às rutáceas e cujos extratos já foram avaliados acerca de sua função antiparasitária, antituberculosa e anti-larval (DO NASCIMENTO CERQUEIRA *et al.*, 2012; PRASHER; SHARMA, 2018; VERA *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2021). Já o composto aqui identificado por MolPort-97054 (ZINC604405131) não foi encontrado em nenhum estudo, nem sua origem foi achada, assim não foi possível determinar se possui atividade biológica identificada.

As moléculas do MolPort possuem maior facilidade de se ligarem à NP, como pode ser observado pelos menores valores de energia livre de Gibbs (dG) e maior valor de pKd, ambos sendo indicativos de, respectivamente, maior espontaneidade da reação de complexação NP-ligante e maior tendência de formação do complexo quando comparado à sua dissociação. Em relação ao pKd, compostos com valores maiores do que aqueles descritos para a VP35 se mostram mais interessantes pois eles teriam maior afinidade do que o peptídeo para se ligarem à NP e, assim, poderiam ser interessantes competidores. Os compostos que atendem a esse parâmetro são NuBBE-310 e todos os compostos da base MolPort.

Em relação à toxicidade, como não há fármacos existentes para tratamento da DVM, não há um padrão com o qual comparar os compostos selecionados. No entanto, um interessante parâmetro a ser analisado é a dose máxima tolerada recomendada (DMTR), que quando inferior ou igual a 0,477 é considerada baixa (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Os compostos que atendem a isso são os compostos de código 2329 e 310 do NuBBE e 89152, 5701, 18828 e 83104 do MolPort. Além disso, a inibição dos canais de potássio codificados por hERG I e II é também desinteressante por poder levar ao desenvolvimento da síndrome do QT longo, que por sua vez pode levar a arritmia fatal (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015; SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006). Os únicos compostos que testaram negativos para inibição de ambos foram os compostos 89152 e 5701 da base MolPort. Ambos estão abaixo do limiar para a DMTR ser considerada baixa, mas possuem hepatotoxicidade. No entanto, isso não necessariamente se trata de um fator eliminatório do

fármaco, uma vez que diversos medicamentos comercializados atualmente possuem efeito hepatotóxico. Para efeitos de comparação, foram feitos também testes de toxicidade dos fármacos Brincidofovir e Favipiravir que chegaram a ter fases clínicas registradas no clinicaltrials.gov do NIH americano apresentaram valores considerados altos de DMTR no pkCSM (0,767 e 1,291, respectivamente). Foram negativos para inibidores dos canais de potássio e só o Favipiravir foi negativo para hepatotoxicidade.

Os compostos obtidos nesse estudo ocupam parte da região à qual o VP35 se liga, podendo funcionar como competidores com esse peptídeo e, dessa forma, evitar que a NP cumpra suas funções. Quando a NP está dissociada da VP35 ela pode se ligar ao RNA viral e impedir que o mesmo seja alvo de enzimas citoplasmáticas, aumentando a chance de proliferação viral e em estágios avançados da proliferação, a NP está associada com a formação do envoltório do vírus (LIU *et al.*, 2017; MESSAOUDI; AMARASINGHE; BASLER, 2015). Assim, é possível que essas moléculas poderiam ser utilizadas tanto para retardar a multiplicação do material genético viral, quanto para perturbar a formação viral e a infecção de novas células. Caso essa intervenção se mostre efetiva, é uma perspectiva interessante no meio de descoberta de fármacos, uma vez que existem diversos vírus que possuem uma proteína semelhante à NP (que se liga ao material genético e possui uma estrutura bilobar) como o vírus parainfluenza 5, hantavirus e o vírus sincicial respiratório (LIU *et al.*, 2017). Testes biológicos com esses compostos para investigar melhor a sua atuação no tratamento da DVM podem ser interessantes não apenas por se tratar de uma doença negligenciada e de alto risco, mas também, caso positivos, podem consolidar uma nova perspectiva no tratamento de doenças virais causadas por vírus da ordem *mononegavirales*, como já foi teorizado com o vírus da influenza (GERRITZ *et al.*, 2011; KAO *et al.*, 2010). Além disso, as moléculas descritas nesse estudo podem ser utilizadas como base para a construção de outros fármacos e compostos que podem se mostrar mais eficazes, menos tóxicos ou de forma a ser utilizada em uma maior diversidade de vírus.

6.1. Os compostos habitaram duas regiões principais na nucleoproteína viral

Entre os compostos analisados, duas conformações principais foram observadas (ver Apêndice A). As moléculas do NuBBE, menores, tenderam a se manter dentro de um bolsão hidrofóbico na proteína, que se encontra entre os aminoácidos Leu246 e Ala270. Já a maioria das moléculas do MolPort, maiores, tenderam a, pelo menos em parte, se encontrar em uma região hidrofóbica mais externa da proteína, que se encontra os aminoácidos Glu234 e

Val244, região que apenas MolPort-18828 (de tamanho mais próximo àquelas do NuBBE) não interagiu, assumindo uma conformação semelhante àqueles compostos do NuBBE. Os compostos maiores (do MolPort) apresentaram notas maiores na ancoragem e tiveram maior facilidade de interagir com a proteína, como pôde ser observado pela variação da energia livre de Gibbs e pela constante de dissociação. Possivelmente a região habitada pelos compostos encontrados no NuBBE é pequena o suficiente para que a maioria dos compostos do MolPort não conseguissem interagir, mas justamente por ser uma região mais interna da proteína a interação foi dificultada. É necessário que essa hipótese seja testada de forma mais aprofundada, mas caso seja positiva, o tamanho de compostos deve ser considerado para o desenvolvimento de fármacos que devem interagir com a NP viral.

7. CONCLUSÃO

A DVM se trata de uma doença que apesar de, recentemente, ocorrer em pequenos surtos localizados, é ainda classificada como uma preocupação de interesse sanitário global pelo alto potencial de transmissão e pela alta taxa de letalidade. No entanto, financiamentos para o desenvolvimento de fármacos e vacinas para essa doença são limitados, garantindo-lhe a denominação de doença negligenciada. Desta forma, esse estudo buscou fazer a triagem *in silico* de dois bancos de dados de compostos naturais e modificados (NuBBE e MolPort) em busca de moléculas que poderiam posteriormente ser testadas para avaliação *in vitro* ou *in vivo* contra a infecção pelo vírus de Marburg.

A partir dos resultados obtidos, o estudo conseguiu encontrar dois compostos (MolPort-89152 e 5701) com características toxicológicas e cinéticas interessantes que poderiam ser utilizados como potenciais competidores pela VP35 com a NP do MARV. Essa competição pode se mostrar interessante, pois poderia perturbar o processo de replicação e infecção do vírus e melhorar o prognóstico da doença em pacientes que a utilizem.

Foi construído um modelo computacional baseado no peptídeo viral para a comparação e seleção das moléculas com base na semelhança com o mesmo e um modelo baseado na nucleoproteína para avaliar a afinidade dos compostos com o alvo. Além disso, foram também avaliadas características cinéticas e farmacológicas para chegar a compostos com propriedades farmacocinéticas interessantes.

Por último, esse estudo utilizou a NP como alvo farmacológico, uma via ainda pouco utilizada, mas que, caso bem-sucedida, pode ser futuramente investigada pela presença comum dessa proteína em vírus de RNA de fita simples. Além disso, as diferenças conformacionais e estéricas observadas entre os compostos e suas propriedades farmacológicas e cinéticas podem auxiliar no processo de produção de novos fármacos que busquem utilizar a NP como alvo.

8. REFERÊNCIAS

ABIR, Mehedy Hasan *et al.* Pathogenicity and virulence of Marburg virus. *Virulence*, v. 13, n. 1, p. 609, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC8986239/>. Acesso em: 1 out. 2024.

AFRICACDC. Marburg Virus Disease (MVD). Disponível em: <https://africacdc.org/disease/marburg-virus-disease-mvd/>. Acesso em: 30 out. 2024.

BAIG, Mohammad Hassan *et al.* Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. *Current Neuropharmacology*, v. 16, n. 6, p. 740, 19 out. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6080097/>. Acesso em: 3 out. 2024.

BIEDENKOPF, Nadine *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Filoviridae*. 2024. *Journal of General Virology*, v. 105, n. 2, p. 001955, 2 fev. 2024. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001955>. Acesso em: 27 set. 2024.

DO NASCIMENTO CERQUEIRA, Cristovam *et al.* Novas N-benzoiltiraminas de *Swinglea glutinosa* (*Rutaceae*). *Química Nova*, v. 35, n. 11, p. 2181–2185, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/PbtXWdBhWNJ7PsqDCBT3rrD/?lang=pt>. Acesso em: 5 nov. 2024.

FEDERAL SELECT AGENTS PROGRAM; DIVISION OF REGULATORY SCIENCE AND COMPLIANCE. Biosafety/Biocontainment Plan Guidance: Definitions. Disponível em: <https://www.selectagents.gov/compliance/guidance/biosafety/definitions.htm>. Acesso em: 27 set. 2024.

FEDERAL SELECT AGENTS PROGRAM; DIVISION OF REGULATORY SCIENCE AND COMPLIANCE. *Select Agents and Toxins List*. Disponível em: <https://www.selectagents.gov/sat/list.htm>. Acesso em: 27 set. 2024.

GERRITZ, Samuel W. *et al.* Inhibition of influenza virus replication via small molecules that induce the formation of higher-order nucleoprotein oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 37, p. 15366–15371, 13 set. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21896751/>. Acesso em: 14 out. 2024.

HAWKINS, Paul C.D. *et al.* Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and cambridge structural database. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 50, n. 4, p. 572–584, 26 abr. 2010. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ci100031x>. Acesso em: 7 out. 2024.

HAWKINS, Paul C.D.; SKILLMAN, A. Geoffrey; NICHOLLS, Anthony. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. *Journal of medicinal chemistry*, v. 50, n. 1, p. 74–82, 1 jan. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17201411/>. Acesso em: 7 out. 2024.

HUME, Adam J.; MÜHLBERGER, Elke. Distinct genome replication and transcription strategies within the growing filovirus family. *Journal of molecular biology*, v. 431, n. 21, p. 4290, 4 out. 2019. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6879820/>>. Acesso em: 28 out. 2024.

HUR, Sun. Double-Stranded RNA Sensors and Modulators in Innate Immunity. *Annual review of immunology*, v. 37, p. 349, 26 abr. 2019. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7136661/>>. Acesso em: 28 out. 2024.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus Taxonomy. Disponível em: <<https://ictv.global/taxonomy/>>. Acesso em: 27 set. 2024.

JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727–748, 4 abr. 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283696908979>>. Acesso em: 8 out. 2024.

KAO, Richard Y. *et al.* Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. *Nature biotechnology*, v. 28, n. 6, p. 600–605, jun. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20512121/>>. Acesso em: 14 out. 2024.

KARAMI, Hassan; LETAFATI, Arash; FAKHR, Somayeh Sadat Hosseini. Can Marburg virus be sexually transmitted? *Health Science Reports*, v. 7, n. 8, 1 ago. 2024. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC11294869/>>. Acesso em: 1 out. 2024.

LASKOWSKI, Roman A.; SWINDELLS, Mark B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of chemical information and modeling*, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 24 out. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21919503/>>. Acesso em: 7 out. 2024.

LIU, Baocheng *et al.* Structural Insight into Nucleoprotein Conformation Change Chaperoned by VP35 Peptide in Marburg Virus. *Journal of Virology*, v. 91, n. 16, p. 825–842, 15 ago. 2017. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.00825-17>>. Acesso em: 17 set. 2024.

MACNEIL, Adam; ROLLIN, Pierre E. Ebola and Marburg Hemorrhagic Fevers: Neglected Tropical Diseases? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 6, 26 jun. 2012. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC3385614/>>. Acesso em: 27 set. 2024.

MEECHAN, Paul J. *et al.* *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 6th. ed. [S.l.]: U. S. Department of Health and Human Services, 2020. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/97733>>. Acesso em: 30 set. 2024.

MESSAOUDI, Ilhem; AMARASINGHE, Gaya K.; BASLER, Christopher F. Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus. *Nature reviews. Microbiology*, v. 13, n. 11, p. 663, 1 nov. 2015. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC5201123/>>. Acesso em: 27 set. 2024.

MITU, Rahima Akter; ISLAM, Md Rabiul. The Current Pathogenicity and Potential Risk Evaluation of Marburg Virus to Cause Mysterious “Disease X”—An Update on Recent Evidences. *Environmental Health Insights*, v. 18, 1 jan. 2024. Disponível em:

<<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/11786302241235809>>. Acesso em: 1 out. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Marburg virus disease*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/marburg-virus-disease>>. Acesso em: 27 set. 2024.

PADOLE, Sachin S *et al.* A review of approaches in computer-aided drug design in drug discovery. *https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/sites/default/files/GSCBPS-2022-0161.pdf*, v. 19, n. 2, p. 075–083, 30 maio 2022. Disponível em: <<https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/content/review-approaches-computer-aided-drug-design-drug-discovery>>. Acesso em: 3 out. 2024.

PILON, Alan C. *et al.* NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5543130/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35543130/)>. Acesso em: 8 out. 2024.

PIRES, Douglas E.V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David 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 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>>. Acesso em: 9 out. 2024.

PRASHER, Parteek; SHARMA, Mousmee. Medicinal chemistry of acridine and its analogues. *MedChemComm*, v. 9, n. 10, p. 1589, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6195008/>>. Acesso em: 5 nov. 2024.

RWANDA BIOMEDICAL CENTRE. MARBURG Virus Information. Disponível em: <<https://rbc.gov.rw/marburg/>>. Acesso em: 4 out. 2024.

SANGUINETTI, Michael C.; TRISTANI-FIROUZI, Martin. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*, v. 440, n. 7083, p. 463–469, 23 mar. 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature04710>>. Acesso em: 29 out. 2024.

SHIFFLETT, Kyle; MARZI, Andrea. Marburg virus pathogenesis - Differences and similarities in humans and animal models. *Virology Journal*, v. 16, n. 1, p. 1–12, 30 dez. 2019. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-019-1272-z>>. Acesso em: 27 set. 2024.

SRIVASTAVA, Devang *et al.* The neglected continuously emerging Marburg virus disease in Africa: A global public health threat. *Health Science Reports*, v. 6, n. 11, 29 nov. 2023. Disponível em: <[pmc/articles/PMC10613755/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/410613755/)>. Acesso em: 27 set. 2024.

SRIVASTAVA, Shriyansh *et al.* Emergence of Marburg virus: a global perspective on fatal outbreaks and clinical challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1239079, 13 set. 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1239079/full>>. Acesso em: 1 out. 2024.

TORRENS-FONTANALS, Mariona *et al.* PlayMolecule Viewer: A Toolkit for the Visualization of Molecules and Other Data. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 64, n. 3, p. 584–589, 12 fev. 2024. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jcim.3c01776>>. Acesso em: 7 out. 2024.

VERA, Sharon Smith *et al.* Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Parasitology research*, v. 113, n. 7, p. 2647–2654, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24781026/>>. Acesso em: 5 nov. 2024.

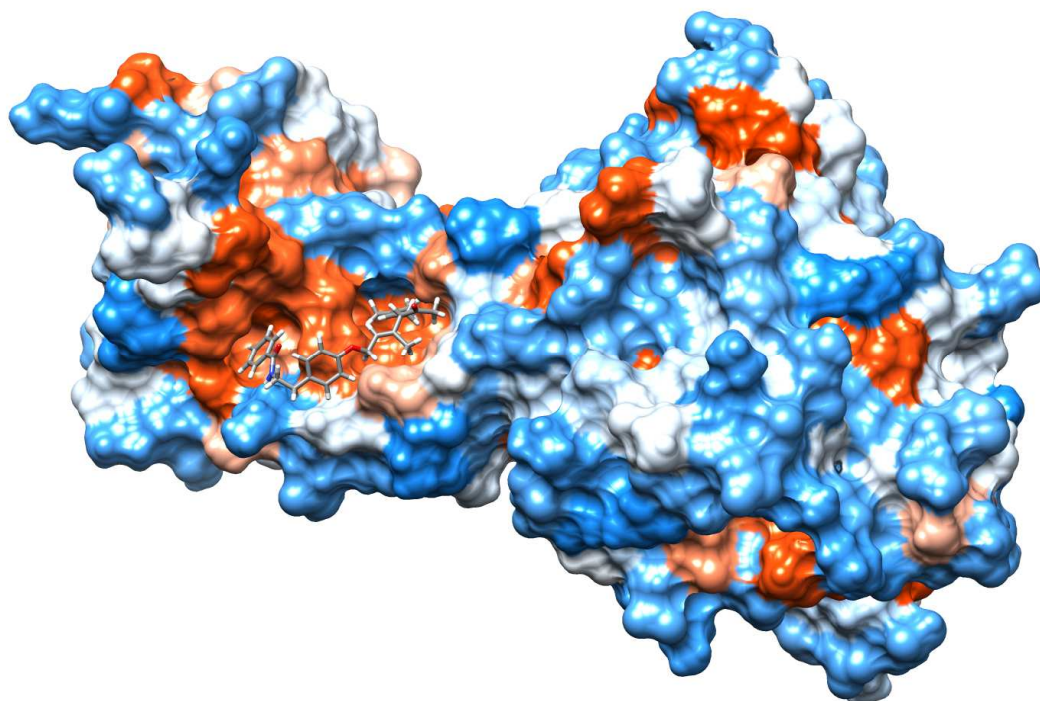
XU, Yuhui *et al.* Traditional Medicinal Plants as a Source of Antituberculosis Drugs: A System Review. *BioMed Research International*, v. 2021, p. 9910365, 2021. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8448615/>>. Acesso em: 5 nov. 2024.

APÊNDICE A – VISUALIZAÇÕES BI- E TRIDIMENSIONAIS DAS MOLÉCULAS SELECIONADAS EM RELAÇÃO À NUCLEOPROTEÍNA VIRAL

Nas imagens tridimensionais gerados pelo programa VIDA, regiões em vermelho indicam aminoácidos com resíduos hidrofóbicos e azuis indicam regiões com aminoácidos hidrofílicos.

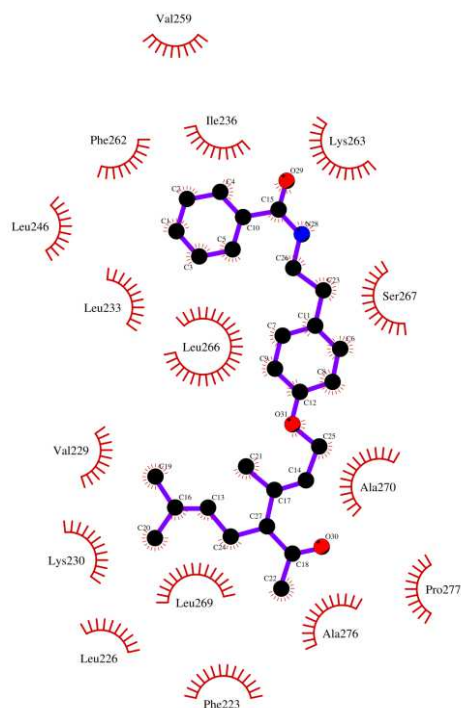
1. Compostos NuBBE

Figura 8 - Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-1479. Imagem gerada pelo programa VIDA.



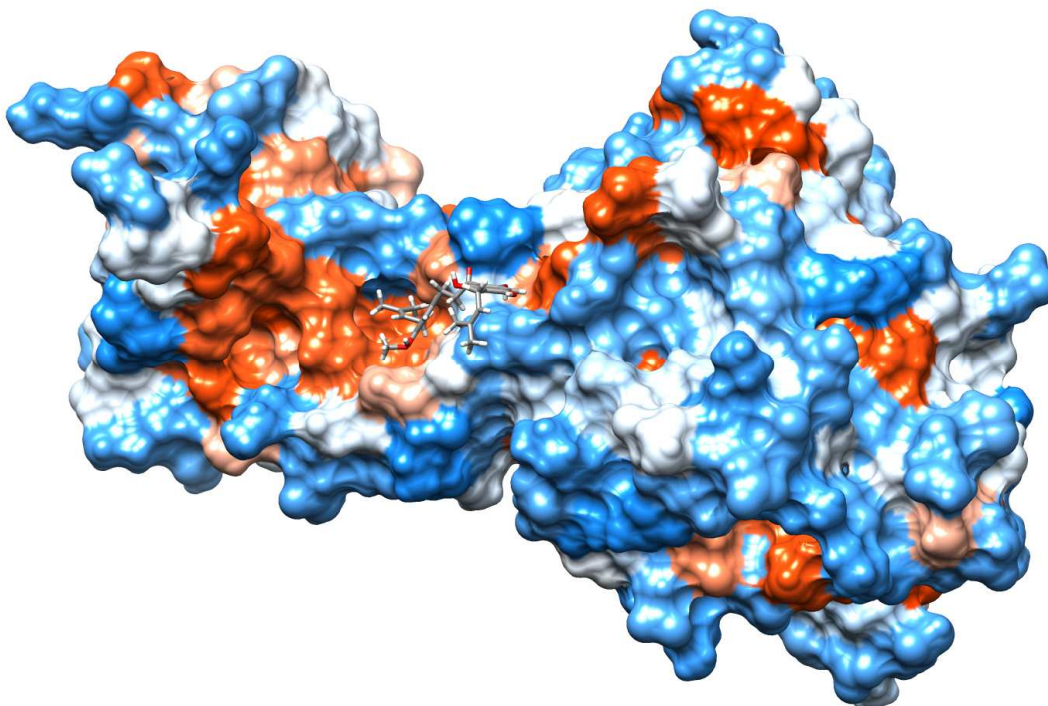
Fonte: do autor.

Figura 9 - Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-1479. Imagem gerada pelo programa LigPlot+.



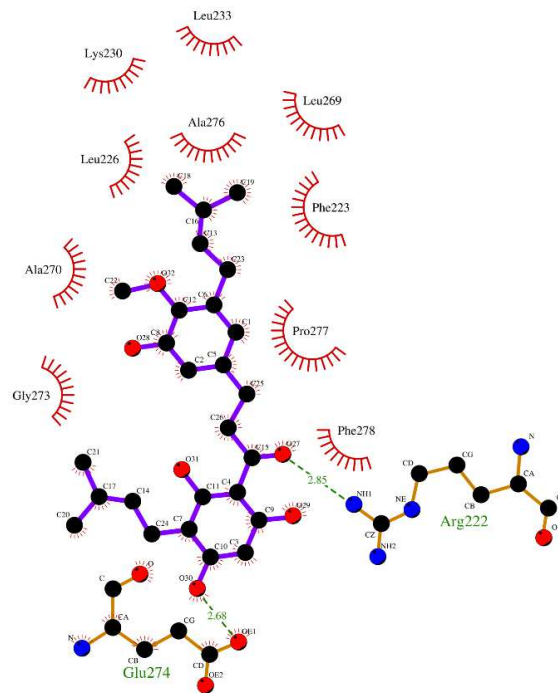
Fonte: do autor.

Figura 10 - Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-2329. Imagem gerada pelo programa VIDA.



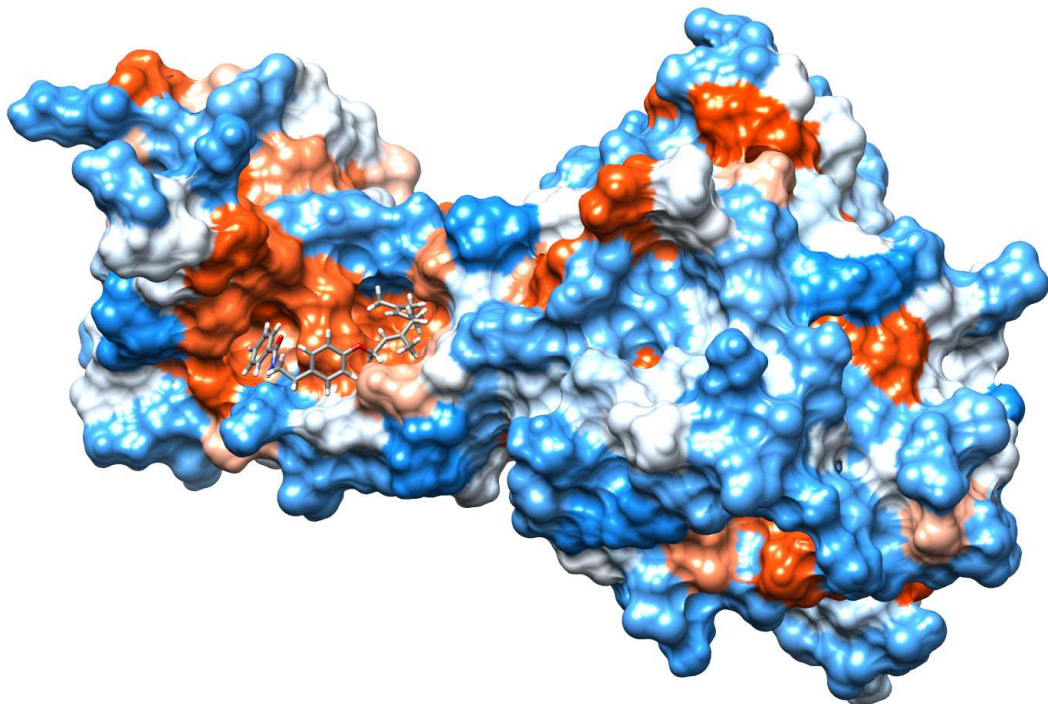
Fonte: do autor.

Figura 11 - Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-2329. Imagem gerada pelo programa LigPlot+.



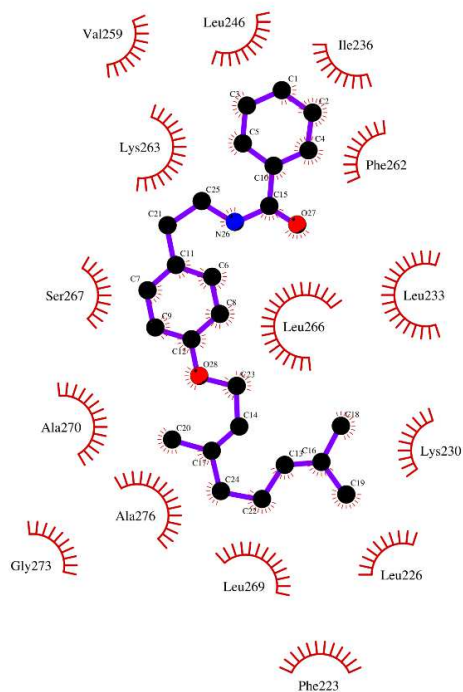
Fonte: do autor.

Figura 12 - Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-976. Imagem gerada pelo programa VIDA.



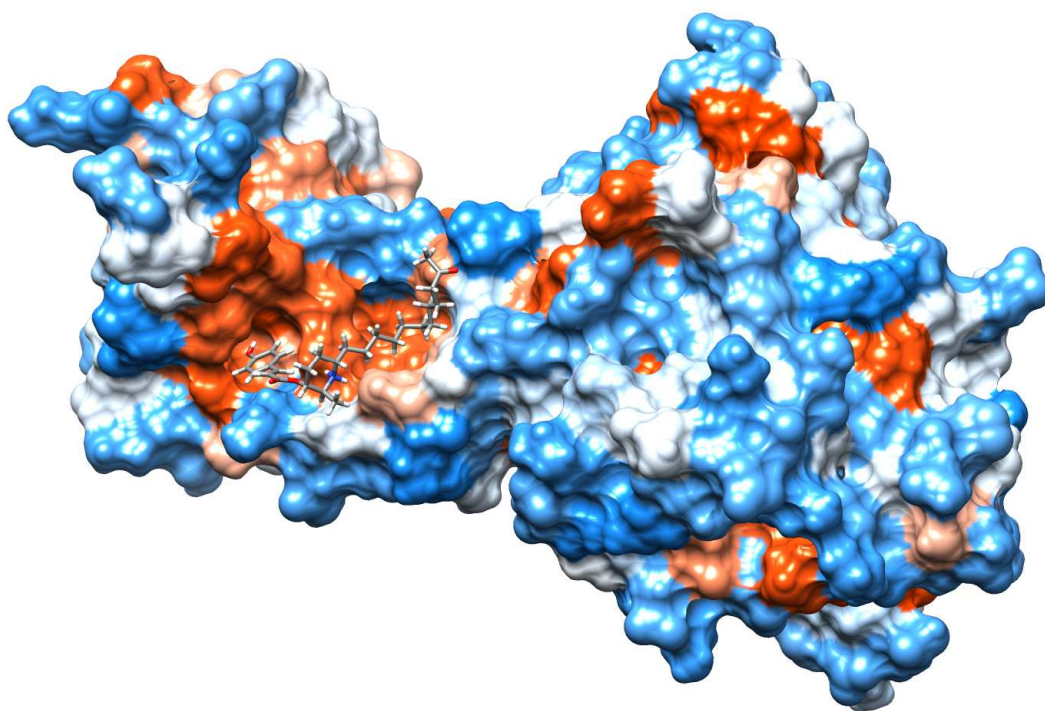
Fonte: do autor.

Figura 13 - Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-976. Imagem gerada pelo programa LigPlot+.



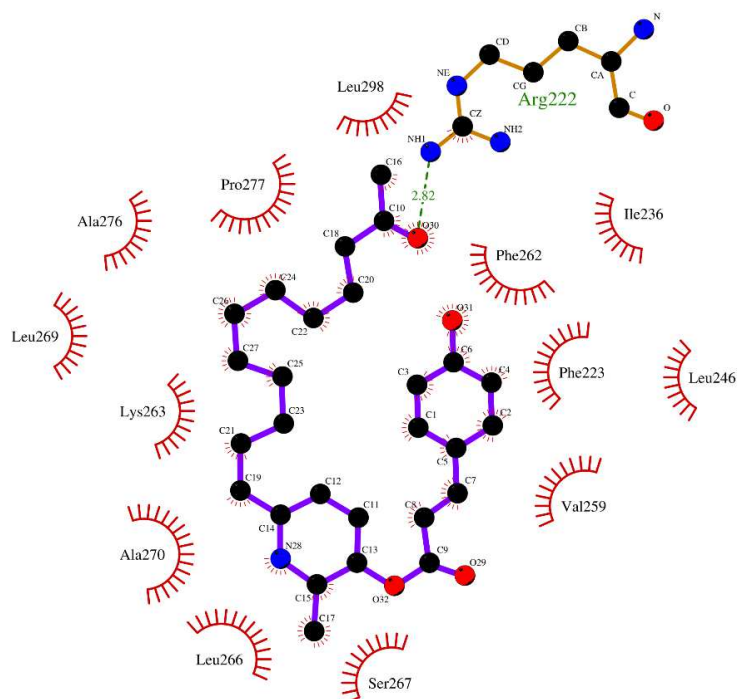
Fonte: do autor.

Figura 14 - Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-310. Imagem gerada pelo programa VIDA.



Fonte: do autor.

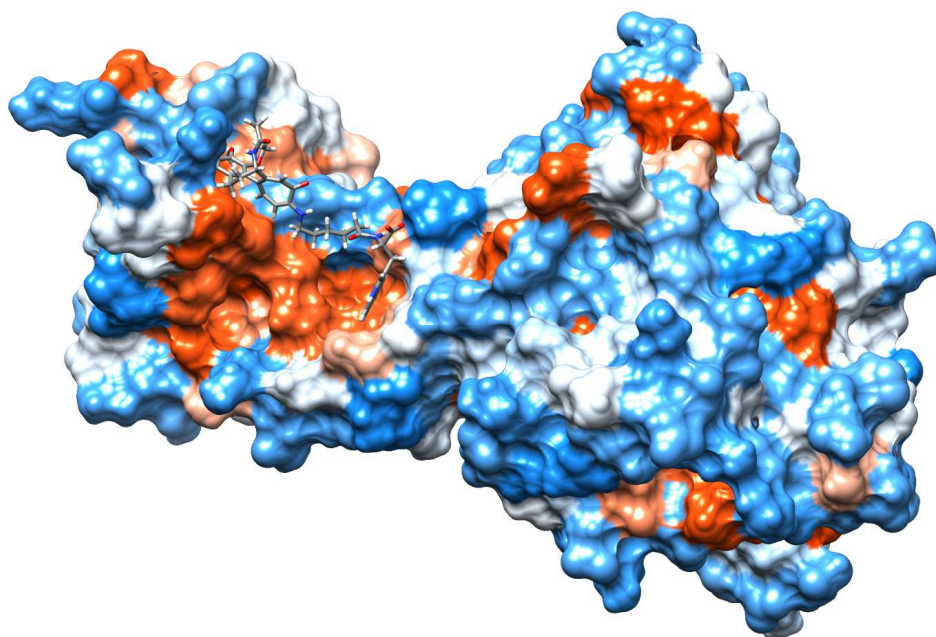
Figura 15 - Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto NuBBE-310. Imagem gerada pelo programa LigPlot+.



Fonte: do autor.

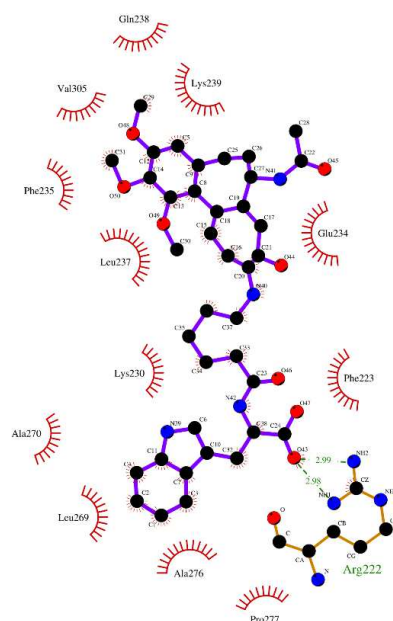
2. Compostos MolPort

Figura 16 - Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto MolPort-89152. Imagem gerada pelo programa VIDA.



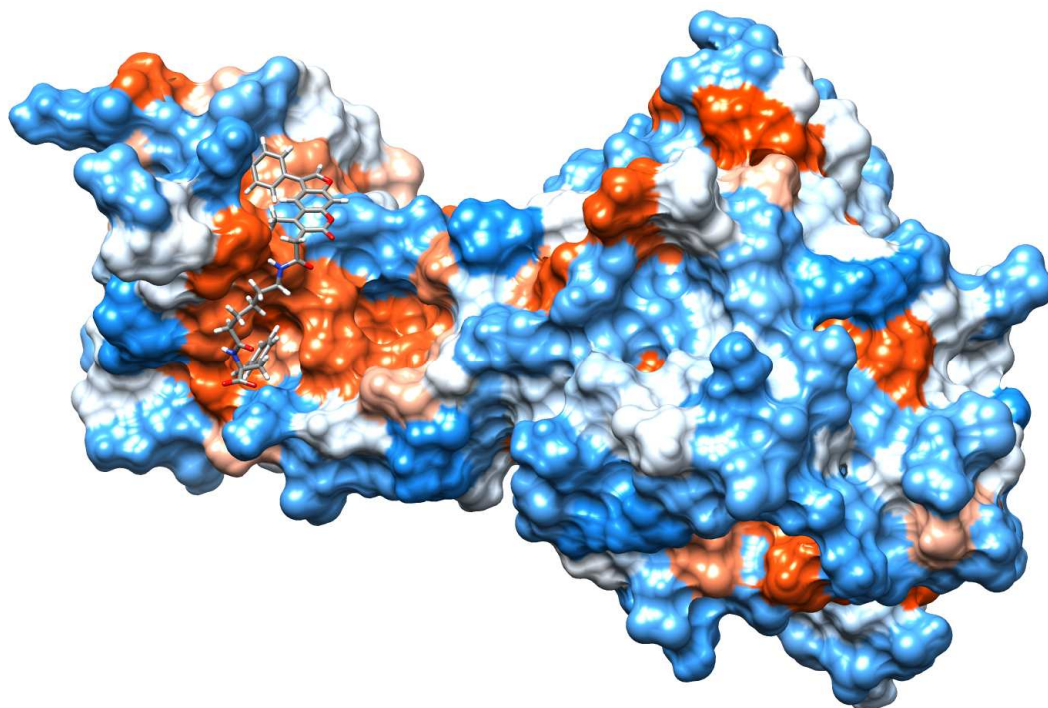
Fonte: do autor.

Figura 17 - Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto MolPort-89152. Imagem gerada pelo programa LigPlot+.



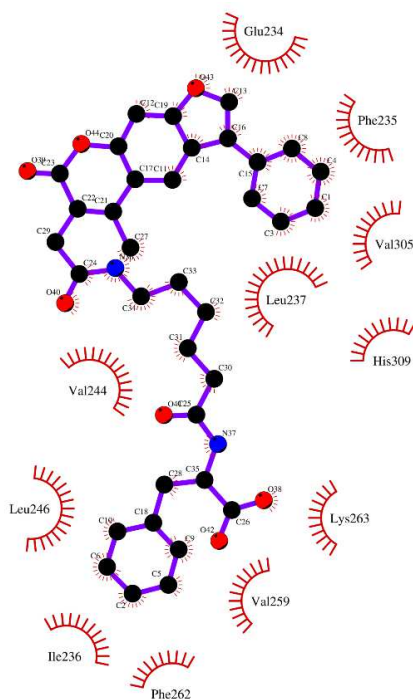
Fonte: do autor.

Figura 18 - Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto MolPort-5701. Imagem gerada pelo programa VIDA.



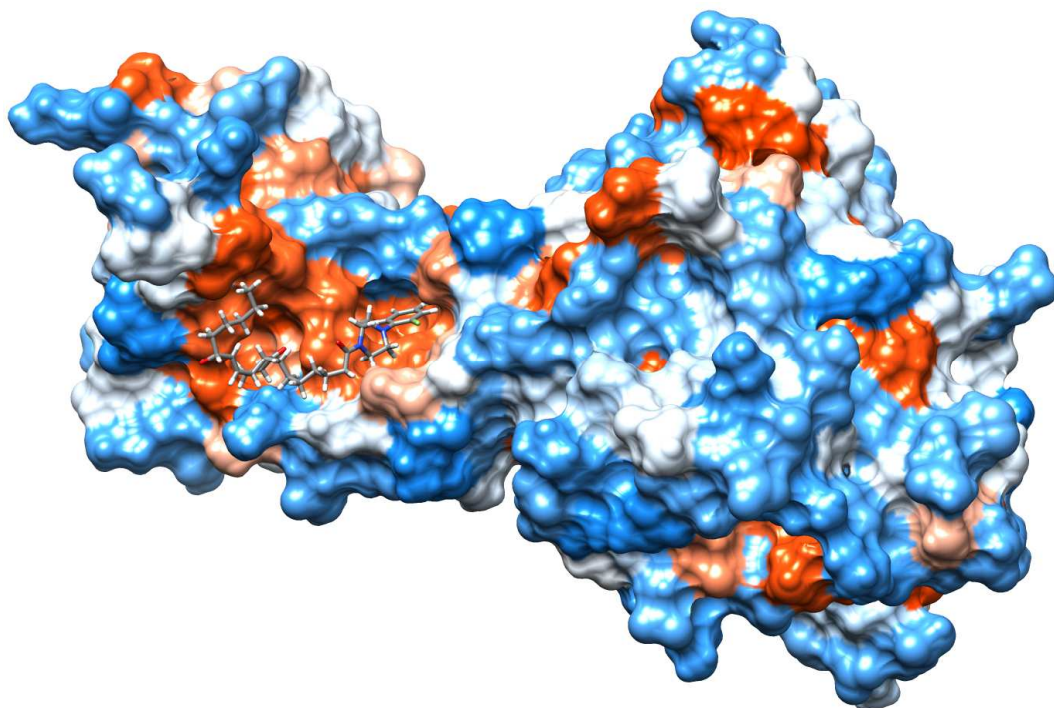
Fonte: do autor.

Figura 19 - Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto MolPort-5701. Imagem gerada pelo programa LigPlot+.



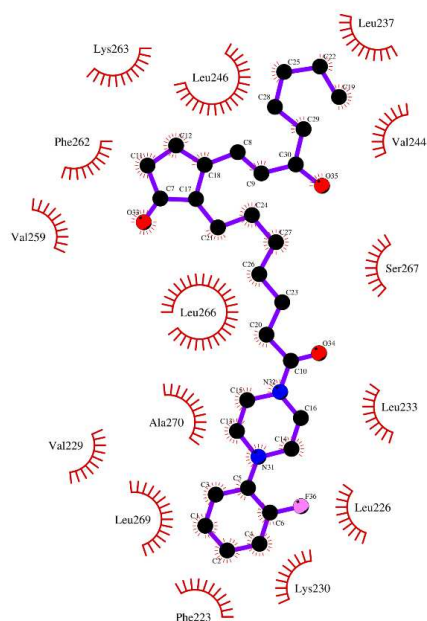
Fonte: do autor.

Figura 20 - Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto MolPort-18828. Imagem gerada pelo programa VIDA.



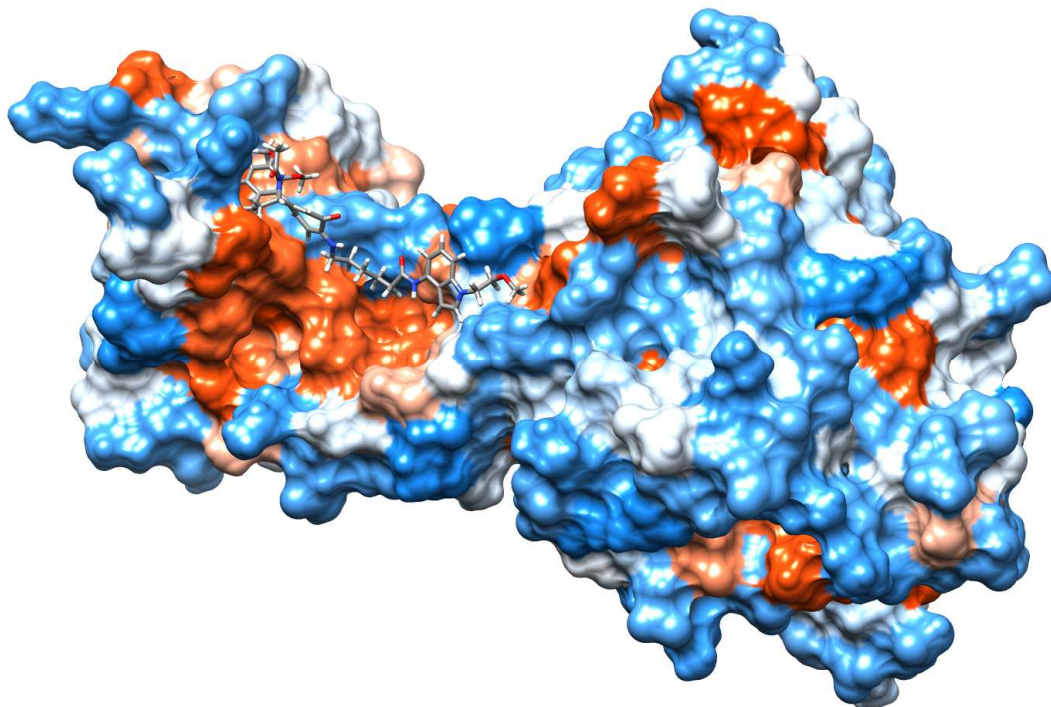
Fonte: do autor.

Figura 21 - Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto MolPort-18828. Imagem gerada pelo programa LigPlot+.



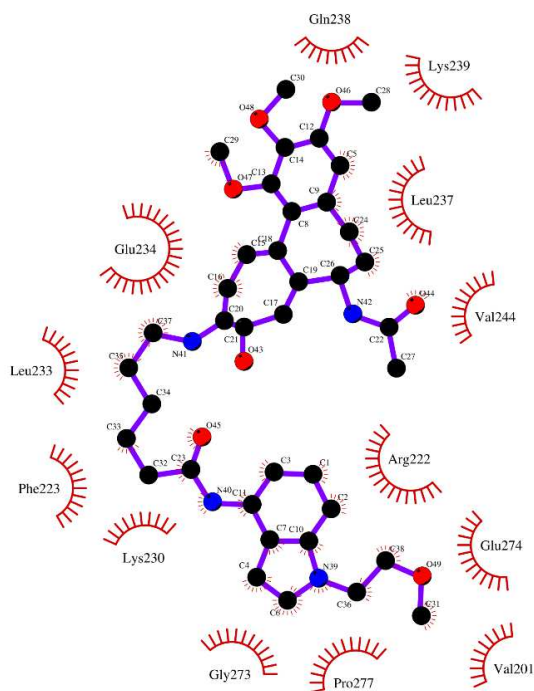
Fonte: do autor.

Figura 22 - Complexo formado entre a nucleoproteína e o composto MolPort-83104. Imagem gerada pelo programa VIDA.



Fonte: do autor.

Figura 23 - Diagrama 2D de ligação entre a nucleoproteína e o composto MolPort-83104. Imagem gerada pelo programa LigPlot+.



Fonte: do autor.