UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VICTOR GAWRILJUK FERRARO OLIVEIRA

Descoberta de candidatos antivirais baseados na enzima NS5 RNA
polimerase RNA-dependente do vírus da febre amarela

São Carlos
2021

VICTOR GAWRILJUK FERRARO OLIVEIRA

Descoberta de candidatos antivirais baseados na enzima NS5 RNA
polimerase RNA-dependente do vírus da febre amarela

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva
Co-orientador: Dr. Andre Schutzer de
Godoy

Versão Original

São Carlos
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Victor Gawriljuk Ferraro

Descoberta de candidatos antivirais baseados na enzima
NS5 RNA polimerase RNA-dependente do vírus da febre
amarela / Victor Gawriljuk Ferraro Oliveira; orientador
Glaucius Oliva; co-orientador Andre Schutzer de Godoy --
São Carlos, 2021.

93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2021.

1. Febre Amarela. 2. NS5. 3. Descoberta de fármacos.
4. Antivirais. I. Oliva, Glaucius, orient. II. Godoy,
Andre Schutzer de, co-orient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Victor Gawriljuk Ferraro Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 23/03/2021

Comissão Julgadora

Dr(a). Glaucius Oliva

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Maria Cristina Nonato

Instituição: (FCFRP/USP)

Dr(a). Carolina Borsoi Moraes

Instituição: (UNIFESP/Diadema)

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo suporte, confiança e amor que me fez sempre acreditar nas minhas capacidades.

À minha companheira de vida Leticia Vasconcelos de Lima, que caminhou comigo durante todos esses anos e nunca deixou faltar apoio, conselhos e carinho.

Aos meus amigos de laboratório, pelas risadas e suporte em todos os momentos.

Ao meu co-orientador, Dr. Andre Schutzer de Godoy, que me conduziu neste processo de amadurecimento científico desde o início.

Ao meu orientador Prof. Dr. Glaucius Oliva, pela atenção e suporte durante os anos em que estive no seu laboratório.

Ao *Drug for Neglected Diseases initiative* e *Medicines for Malaria Ventura* por fornecer os compostos para a realização desse trabalho. À Dr^a. Myrna Bonaldo por gentilmente fornecer os *amplicons* de febre amarela e ao Prof. Dr. André Luiz Bertelli Ambrósio por oferecer os plasmídeos de levedura.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Instituto de Física de São Carlos, que garantiu todo o acesso ao conhecimento e infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

À CNPq (processo nº131907/2019), pelo auxílio financeiro para desenvolver os primeiros dois meses deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº2018/25773-6), e bolsa estágio de pesquisa no exterior (processo nº2019/25407-2) e todas as oportunidades que essa me concedeu.

“O maior bem para um homem é examinar todos os dias sobre a virtude e os outros argumentos. Uma vida não examinada não é digna de ser vivida.”

Platão, Apologia de Sócrates

RESUMO

OLIVEIRA, V. G. F. **Descoberta de candidatos antivirais baseados na enzima NS5 RNA polimerase RNA-dependente do vírus da febre amarela.** 2021. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

O ressurgimento da febre amarela em regiões não-endêmicas do Brasil e do continente africano entre 2016 a 2018, colocou em risco regiões urbanas com alta densidade populacional e baixa cobertura vacinal. A ausência de um tratamento para a febre amarela, assim como a necessidade de fármacos para o controle de vírus emergentes, reforça a importância na busca por novos antivirais. O objetivo deste trabalho foi a busca de candidatos antivirais a partir da enzima NS5 RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) do vírus da febre amarela. Para este propósito, a produção da forma recombinante dessa enzima, assim como, dois ensaios de alongação de uma fita de RNA foram padronizados. O primeiro consistiu no uso de nucleotídeos modificados e uma reação acoplada à fosfatase alcalina, enquanto no segundo, a atividade da proteína foi medida pela sonda intercalante SYBR Green I (SGI). O ensaio com a sonda SGI apresentou maiores intensidades de fluorescência e maior facilidade na implementação em experimentos de média escala, logo, ele foi escolhido para a busca e caracterização de inibidores. Em seguida, realizou-se a triagem da biblioteca de compostos MMV/DNDi *Pandemic Response Box* e foram identificadas 25 moléculas como inibidores da RdRp. Diversos compostos apresentaram potência inibitória na faixa de nanomolar, indicando a possível presença de falsos-positivos na triagem. As moléculas foram validadas por ensaios de interferência ao SGI e 18 compostos interferiram de maneira significativa com a sonda. Dentre os inibidores considerados confiáveis pelo contra-ensaio, a Clofazimina, TTP-8307 e MMV218827 apresentaram potência inibitória na faixa de 0.2 a 4 micromolar. Apesar da alta potência demonstrada pelo MMV218827 ($IC_{50} = 0.2 \mu M$), ele foi desconsiderado como um candidato promissor após desestabilizar a RdRp em ensaios de fluorimetria de varredura diferencial e, também, por pertencer a uma classe de moléculas que causam inibição inespecíficas em proteínas. A Clofazimina ($IC_{50} = 4 \mu M$) e TTP-8307 ($IC_{50} = 4 \mu M$) aumentaram a estabilidade da proteína e apresentaram estruturas químicas inéditas para inibidores de RdRp, expandindo o desenvolvimento de novas moléculas para esse alvo. Ensaios de cristalização também foram realizados, no entanto, não foi possível obter cristais da proteína. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o ensaio de alongação com a sonda SGI pode ser utilizado para triagens de inibidores da RdRp do vírus da febre amarela, com a Clofazimina e o TTP-8307 sendo estes possíveis candidatos a antivirais para esse vírus, contudo, serão necessários estudos futuros para a avaliação de suas atividades em células.

Palavras-chave: Febre amarela. NS5. Descoberta de fármacos. Antivirais.

ABSTRACT

OLIVEIRA, V. G. F. **Discovery of antiviral candidates based on the yellow fever virus enzyme NS5 RNA-dependent RNA polymerase.** 2021. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

The yellow fever resurgence in non-endemic regions of Brazil and Africa between 2016 and 2018, put at risk urban regions with high population density and low vaccination coverage. The lack of a yellow fever treatment, as well as the need for drugs that can control emerging viruses, highlights the importance in the discovery of new antivirals. The goal of this work was the discovery of antiviral candidates with the yellow fever virus RNA dependent RNA polymerase as target. In order to achieve this goal, the production of the recombinant form of this enzyme as well as two RNA strand elongation assays were standardized and evaluated for inhibitor screening. The first used modified nucleotides coupled to an alkaline phosphatase reaction, while in the second, protein activity was measured with the intercalating dye SYBR Green I. The SGI assay was used for the screening and evaluation of inhibitors, since it had a higher fluorescence intensity and easier implementation in medium scale experiments. Afterwards, we screened the compound library *Pandemic Response Box* and identified 25 compounds as RdRp inhibitors. Several compounds had potency within the nano molar range, showing potential existence of false-positives in the screening. The molecules were validated with an SGI interference assay and 18 compounds significantly interfered with the dye. Among the inhibitors considered reliable, Clofazimine, TTP-8307 and MMV218827 had potency within 0.2 to 4 micromolar. Despite the high potency of MMV218827 ($IC_{50} = 0.2 \mu M$), the compound was disregarded as a promising candidate after destabilizing the RdRp in thermal shift assays and because it belongs to a class of compounds that shows nonspecific inhibition of proteins. Clofazimine ($IC_{50} = 4 \mu M$) and TTP-8307 ($IC_{50} = 4 \mu M$) increased the RdRp stability and have chemical scaffolds new to RdRp inhibitors, expanding the development of new inhibitors for this target. Crystallization assays were also performed; however, it was not possible to obtain suitable crystals. Thus, the results obtained herein show that the SGI elongation assay can be used to screen compounds for the yellow fever virus RdRp, and that Clofazimine as well as TTP-8307 are possible antiviral candidates for this virus. Future studies should evaluate the activity of those compounds in cell-based assays.

Key-words: Yellow fever. NS5. Drug discovery. Antivirals.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa de classificação de risco de epidemias de febre amarela por país, de acordo com a OMS.....25
- Figura 2 - A) Mudança na circulação do YFV no Brasil durante os últimos 26 anos. B) Número de casos e taxa de letalidade da febre amarela registrados no Brasil.29
- Figura 3 - Organização estrutural dos flavivírus. O RNA genômico dos flavivírus codifica dez proteínas, sendo três estruturais e sete não-estruturais.....31
- Figura 4 - A) Estrutura do domínio RdRp da YFV. PDB (6QSN) B) Motivos estruturais conservados em diferentes RdRp e resíduos importantes do sítio ativo: coordenação dos metais (D668, D667 e D535), reconhecimento e estabilização do NTP (N612, S603, D540, R473) e interação com as bases da fita molde (Y477 e I475). Legenda de cores: Motivo A (Amarelo), B (Laranja), Motivo C (Vermelho), Motivo D (Ciano), Motivo E (Azul), Motivo F (Verde), Motivo G (Roxo).....33
- Figura 5 - Formação da ligação fosfodiéster pela RdRp. A) Esquema da reação de formação da ligação fosfodiéster realizada pela RdRp. B) Esquema da catálise da reação pela coordenação de metais (A e B) em RNA polimerases. C) Estrutura cristalográfica da RdRp do vírus da Hepatite C (HCV) em complexo com RNA e UDP (PDB:4WTA).35
- Figura 6 - Amplicons contendo as sequências codificantes das proteínas NS3 (amostras 1 e 2) e NS5 (amostras 3 e 4). Em 6, o marcador molecular...41
- Figura 7 - Mapa do vetor pBEVY^{YFV}_RdRp-TEV utilizado nesse trabalho.....43
- Figura 8 - Método de difusão de vapor A) Uma gota contendo solução de cristalização e proteína é selada em um reservatório com um alto volume de solução de cristalização em relação à gota. A diferença de concentração entre a gota e solução gera uma troca de vapor no sentido gota-solução. B) Esquema de um diagrama de cristalização do método de difusão de vapor. Circulo aberto- Condição inicial. Quadrado Preto – Núcleo cristalino, Estrela – Cristal.47
- Figura 9 - Modelo esquematizado dos ensaios de elongação FAPA. A) RdRp inicia a replicação de uma fita simples de RNA 3'UTR-U₃₀ usando BBT-ATP como substrato. B,C) Na medida em que a fita é transcrita, ocorre a liberação de BBT-PP_i. D) A enzima CIP é adicionada em tampão de parada, inativando a RdRp, e desfosforilando o BBT-PP_i para BBT e 2P_i. Uma vez liberado, o BBT passa a emitir um sinal de fluorescência proporcional à quantidade de BBT-PP_i formado na polimerização.....49

Figura 10 - Modelo esquematizado do ensaio de elongação RTPA A) RdRp inicia a replicação de uma fita simples de RNA 3'UTR-U ₃₀ , usando ATP como substrato B, C) Na medida em que a fita é transcrita, o SGI intercala com as duplas fitas de RNA e passa a fluorescer com maior intensidade, gerando um sinal proporcional à quantidade de dupla fita formada durante a polimerização.	51
Figura 11 - Resultados da Clonagem - A) Gel eletroforese 1% agarose do PCR de colônia do vetor pBEVY ^{YFV} _{RdRp-TEV} Coluna 1 - Marcador Molecular Coluna 2 - PCR de Colônia. B) Imagem de microscopia de fluorescência de uma cultura de expressão da linhagem transformada com o vetor pBEVY ^{YFV} _{RdRp-TEV}	57
Figura 12 - Resultados da purificação da RdRp. A) Gel de SDS-PAGE 12.5% M - Marcador molecular. 1- Passagem do extrato 2 – Fração solúvel do lisado 3 - Lavagem 10% Tampão B 4- Lavagem 20% Tampão B 5- Eluição B) Cromatograma da exclusão molecular. C) Gel SDS-PAGE 12.5% 1- Fração coletada na segunda cromatografia de afinidade. 2- 7 Frações coletadas na cromatografia de exclusão molecular de acordo com o cromatograma mostrado no item B.	59
Figura 13 - Resultados da cristalização da RdRp fusionada a GFP. A) Gel de SDS-PAGE 12.5% E- Eluição da cromatografia de afinidade 1-6 Frações da cromatografia de exclusão molecular. B) Cromatograma da exclusão molecular. C) Condições de cristalização que deram origem aos cristais da proteína. D) Imagem dos cristais obtidos na condição G3 do kit Morpheus. E) Padrão de difração de um dos cristais obtidos na condição G3.	60
Figura 14 - Gota de cristalização da condição A8 do kit AmS04. A) Imagem da gota. B) Imagem UV da gota.	62
Figura 15 - Curva de calibração do BBT-ATP. A) Gráfico da atividade pelo tempo da CIP em diferentes concentrações de BBT-PPi. B) Ajuste linear dos valores de intensidade após 50 min de reação pela concentração de BBT-PPi.	63
Figura 16 - Padronização do ensaio FAPA. A) Curvas de atividade pelo tempo para o ensaio FAPA em duas temperaturas diferentes. B) Curvas de atividade pelo tempo em diferentes concentrações de BBT-ATP.	64
Figura 17 - Ensaio de cinética enzimática da RdRp utilizando o ensaio FAPA. Valores da velocidade de reação pela concentração de BBT-ATP em reações contendo 80 nM RdRp e 200 nM 3'UTR-U ₃₀ . Os valores de intensidade foram convertidos para nM de BBT-PPi a partir da curva de calibração.	65

Figura 18 - Ensaio de elongação RTPA – A) Curva de atividade pelo tempo na presença de 1x SGI, 20 μ M ATP, 250 nM 3'UTR-U ₃₀ e 80 nM RdRp. B) Gráfico de barras da intensidade do SGI após uma hora de reação com a sonda adicionada no início ou final do ensaio.	66
Figura 19 - Padronização do ensaio de elongação RTPA A) Curva de atividade pelo tempo em diferentes concentrações de 3'UTR-U ₃₀ com concentração fixa de RdRp (80 nM) e ATP (20 μ M). B) Curva de atividade pelo tempo em diferentes concentrações de ATP, com concentração fixa de RdRp (80 nM) e 3'UTR-U ₃₀ (100 nM) C) Curva de atividade pelo tempo em diferentes concentrações de RdRp, concentração de ATP e 3'UTR-U ₃₀ fixas em 20 μ M e 100 nM respectivamente.	67
Figura 20 - Ensaios de cinética enzimática da RdRp a partir do ensaio RTPA. A) Curva de cinética enzimática da RdRp em diferentes concentrações de ATP, com concentrações fixas de proteína (80 nM) e 3'UTR-U ₃₀ (100 nM). B) Curva de cinética enzimática da RdRp em diferentes concentrações de 3'UTR-U ₃₀ , com concentrações fixas de proteína (80 nM) e ATP (20 μ M).....	68
Figura 21 - Gráfico da atividade relativa de cada composto da biblioteca PRB. Esferas vermelhas – reações controle. Esferas Cinzas – atividade relativa de cada composto testado.....	71
Figura 22 - Exemplo de curvas dose resposta de compostos que apresentaram mais de 100% de inibição nas concentrações mais elevadas de ligante. Fonte: Elaborada pelo autor.	72
Figura 23 - Esquema dos sinais obtidos para amostras de 3'UTR-U ₃₀ na presença ou não do composto. A) Relação entre sinais para uma interferência entre 0 e 100. B) Relação entre sinais obtidos para uma interferência maior do que 100.	74
Figura 24 - Curvas dose resposta de compostos que tiveram menos de 30% de interferência nos ensaios de validação.	76
Figura 25 - Estabilidade da proteína nos compostos que apresentaram baixa interferência.	77
Figura 26 - Comparação entre o grupo de fenol-sulfonamidas PAIN (A) e o composto MMV218827 (B).....	78
Figura 27 - Estruturas químicas do TTP-8307 e Clofazimina.	79

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das soluções utilizadas para a produção do meio SD-URA...	44
Tabela 2 - Comparação entre os valores de K_m do substrato BBT-ATP com dados da literatura.	65
Tabela 3 - Comparação dos valores de K_m obtido com a literatura.....	69
Tabela 4 - Valores de Fator-Z calculados para cada uma das placas da biblioteca PRB.	72
Tabela 5 - Potência e porcentagem de Interferência dos compostos identificados na triagem da biblioteca PRB.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina trifosfato
DENV	Vírus da dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
DSF	Ensaio de fluorimetria de varredura diferencial
CIP	Fosfatase alcalina de intestino de bezerro
FAPA	Ensaio de elongação acoplado à fosfatase alcalina
HCV	Vírus da Hepatite C
IC ₅₀	Concentração inibitória média
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
NTP	Nucleosídeos trifosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRB	<i>Pandemic Response Box</i>
RdRp	RNA polimerase RNA-dependente
RNA	Ácido ribonucleico
RTPA	Ensaio de elongação em tempo real
SIG	SYBR Green I
TEV	Protease do Vírus do mosaico do tabaco
WNV	Vírus do oeste do Nilo
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus da Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Febre Amarela	23
1.1.1	A História da febre amarela	23
1.1.2	Epidemiologia	24
1.1.3	Sintomas da Febre Amarela	26
1.1.4	Vacina contra a febre amarela	26
1.1.5	A busca por um tratamento	27
1.1.6	O ressurgimento da febre amarela no Brasil e no mundo	28
1.2	O vírus da febre amarela	30
1.3	NS5 RNA polimerase RNA-dependente – Estrutura e Função	32
1.4	A RNA polimerase RNA-dependente como alvo para a busca de antivirais	36
1.5	Descoberta de novos antivirais para vírus emergentes	37
2	OBJETIVOS	39
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Aquisição dos genes do vírus da febre amarela	41
3.2	Clonagem da enzima RdRp no vetor de expressão em levedura	41
3.3	Transformação em leveduras	43
3.4	Expressão em larga escala	45
3.5	Purificação da RdRp de YFV	45
3.6	Cristalização, <i>seeding</i> e coleta de dados	46
3.7	Padronização do ensaio de elongação da RdRp acoplado à fosfatase alcalina	48
3.8	Curva de Calibração BBT-ATP	50
3.9	Padronização do ensaio de elongação da RdRp em tempo real	50
3.10	Determinação das constantes de Michaelis-Menten	51
3.11	Triagem da biblioteca <i>Pandemic Response Box</i>	52
3.12	Determinação do IC ₅₀	53
3.13	Ensaio de interferência	54
3.14	Ensaio de fluorimetria de varredura diferencial	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Clonagem e Expressão	57
4.2	Purificação	58

4.3	Cristalização	59
4.4	Ensaio de atividade.....	62
4.4.1	Ensaio de alongação da RdRp acoplado a fosfatase alcalina (FAPA).....	63
4.4.2	Ensaio de alongação da RdRp em tempo real (RTPA).....	66
4.4.3	Comparação entre os ensaios de alongação.....	70
4.5	Triagem da biblioteca <i>Pandemic Response Box</i>	71
4.6	Validação dos compostos	73
4.6.1	Ensaio de interferência	73
4.6.2	Fluorimetria de varredura diferencial (DSF)	76
4.7	Clofazimina e TTP-8307 como candidatos a antivirais contra a o vírus da febre amarela.....	79
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Febre Amarela

1.1.1 A História da febre amarela

Ao longo da história da humanidade, a febre amarela sempre esteve entre as doenças infecciosas mais letais e temidas do mundo. Originária do continente africano a febre amarela chegou às Américas durante o período da escravidão, quando navios negreiros transportavam escravos acometidos pela doença e o seu agente transmissor.¹ O primeiro surto relatado ocorreu na península de Yucatán, no México, em 1648. No entanto, o primeiro registro da doença no Brasil aconteceria somente 37 anos depois, na capital de Pernambuco.¹⁻²

Durante os séculos 17 e 19 diversas epidemias foram relatadas em diferentes regiões da África, América e Europa, que evidenciaram a severidade da doença, conhecida como febre amarela devido aos seus sintomas de icterícia. Como exemplo, pode-se destacar as epidemias de 1793 na Filadélfia, responsável pela morte de 10% da população da cidade e a do Rio de Janeiro, em 1850, que levou 4.000 pessoas à morte e deu início a um dos maiores problemas de saúde pública da cidade devido à continuidade da doença nos anos seguintes.³⁻⁴

Além da saúde pública, políticas nacionais também foram afetadas pela febre amarela, como durante a Guerra Hispânico-Americana em Cuba, quando a doença matou mais soldados do que a própria guerra em si, e no atraso da construção do Canal do Panamá, na qual boa parte dos trabalhadores morreram por causa da doença.⁵⁻⁶

Apesar dos diversos surtos, foi apenas a partir do final do século XIX que o seu agente transmissor foi determinado. Em 1881, o epidemiologista cubano Carlos Finlay propôs que a doença era transmitida por mosquitos *Aedes aegypti*.⁷ No entanto, seus estudos só foram comprovados em 1900 pelo americano Walter Reed, a partir de uma iniciativa para evitar as mortes causadas pela febre amarela em Cuba.⁸ Desde então, o controle do mosquito nos principais centros epidêmicos do mundo foi utilizado para a erradicação da doença.

No Brasil, a partir de 1903, Oswaldo Cruz iniciou campanhas sanitárias no Rio de Janeiro com o intuito de eliminar o mosquito transmissor na então capital do país. O sanitarista alcançou o controle da doença após 4 anos, sanando um problema de saúde pública que afligia a cidade desde 1850 e que causou durante esse período mais de 60.000 mortes.⁹⁻¹⁰

Em 1916, a então criada Fundação Rockefeller contribuiu para ampliar o conhecimento sobre o agente causador da doença. Um dos seus objetivos era a erradicação da febre amarela através da eliminação do mosquito transmissor *A. aegypti*.¹¹ Entretanto, em 1932 descobriu-se no Brasil que a doença possuía um ciclo silvestre entre diferentes espécies de mosquitos e primatas não-humanos, impossibilitando a sua erradicação.⁹

Embora os trabalhos de Reed em 1900 apresentassem observações que a doença era causada por um vírus, ele só foi isolado em 1927 por Adrian Stokes.¹²⁻¹³ A linhagem isolada serviu para o desenvolvimento da vacina 17D por Max Theiler em 1937, que até hoje é utilizada para o controle da doença. Os estudos epidemiológicos e o desenvolvimento da vacina contribuíram para garantir o fim de surtos urbanos da doença no Brasil em 1942, assim como o controle do vetor *A. aegypti* na América do Sul, o que tornou a febre amarela uma doença controlada e negligenciada nos anos seguintes.¹⁴

1.1.2 Epidemiologia

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa, de curta duração, causada pelo vírus da febre amarela (*Yellow Fever virus* - YFV) e transmitida por três ciclos distintos: urbano, silvestre e intermediário. O ciclo urbano é típico de outras arboviroses e consiste em um ciclo de infecção entre homem-mosquito-homem, sendo o *Aedes aegypti* o vetor principal.¹⁵ O ciclo silvestre, por sua vez, envolve diferentes espécies de mosquitos como vetor e primatas não-humanos como hospedeiros. Já o ciclo intermediário ocorre apenas no continente africano, entre os ciclos urbanos e silvestres, envolvendo diferentes mosquitos do gênero *Aedes*.¹⁶

Com o controle vacinal nos ambientes urbanos, na América do Sul a febre amarela é transmitida principalmente pelos ciclos silvestres, com o homem servindo como um hospedeiro acidental ao adentrar regiões endêmicas, enquanto no continente africano, o vírus é transmitido principalmente pelo ciclo intermediário.¹⁷

O ciclo silvestre é de extrema importância para o monitoramento do YFV na América do Sul, uma vez que diferentemente da África, os primatas não-humanos acometidos pela doença acabam desenvolvendo sintomas severos que os levam à morte, permitindo o mapeamento do vírus através de epizootias.¹⁸

Figura 1 - Mapa de classificação de risco de epidemias de febre amarela por país, de acordo com a OMS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Atualmente a febre amarela é endêmica nas regiões tropicais do continente africano e América do Sul, com a maioria dos casos (~ 90%) ocorrendo naquele continente. De acordo com estudos de modelagem feitos com dados do continente africano, estima-se que em 2013 houve entre 84.000-170.000 casos de febre amarela severa no continente, com 29.000-60.000 mortes nesse período.¹⁹

1.1.3 Sintomas da Febre Amarela

Como muitas doenças infecciosas, a febre amarela apresenta um amplo espectro de severidade, com um quadro clínico que pode ser desde assintomático até fatal. Para pacientes com infecção moderada, os sintomas podem variar de febre, dor de cabeça e dores no corpo. Após o estágio de infecção, os sintomas desaparecem e o vírus é liberado da circulação sanguínea na maior parte dos infectados.

No entanto, para cerca de 20% dos pacientes, os sintomas retornam de forma mais severa, gerando manifestações hemorrágicas, insuficiência renal e insuficiência hepática, além dos sintomas característicos da febre amarela, como icterícia, desidratação e hemorragia gastrointestinal. Essa fase da doença é chamada de fase visceral, com taxa de mortalidade dos pacientes que varia de 50 a 80%, tipificando a febre amarela como uma doença de grande risco quando comparada a outras febres hemorrágicas virais.²⁰

1.1.4 Vacina contra a febre amarela

A vacina contra a febre amarela foi desenvolvida na década de 1930 por Max Theiler em conjunto com a Fundação Rockefeller, através da atenuação da linhagem *Asibi*.²¹ A descoberta concedeu a Theiler o prêmio Nobel de Medicina em 1951. Atualmente, três linhagens derivadas são utilizadas como vacina: 17D-204, 17D-213 e 17DD, sendo a última fabricada no Brasil desde 1940 pela Fundação Oswaldo Cruz.²² As vacinas da febre amarela são consideradas as vacinas de vírus atenuado mais eficientes e seguras já produzidas, com diversos estudos sugerindo uma imunização por toda a vida com uma única dose para a maioria dos vacinados.²³ Além da imunização duradoura, a vacina possui uma rápida resposta imune, com cerca de 80% dos vacinados soropositivos em até 10 dias após a vacinação de dose completa e 99% após 28 dias, tanto para doses completas como fracionadas, revelando-se uma ferramenta extremamente eficaz para a prevenção e contenção de surtos.²⁴

Desde sua criação em 1937, já foram administradas mais de 500 milhões de doses da vacina para prevenir surtos e proteger a população. A Organização Mundial de Saúde (OMS) realiza diversas campanhas de vacinação seguidas por imunizações infantis em diversas regiões endêmicas a fim de controlar novos surtos.^{20,25}

Apesar de ser considerada segura, a vacina 17D pode causar reações adversas, incluindo o desenvolvimento da fase viscerotrópica ou doenças neurológicas, com estimativas que variam entre 0,1- 1 casos por milhão de doses, sendo esses riscos maiores para pessoas acima de 60 anos.²⁶ Por esses motivos, a vacina é contraindicada principalmente para pessoas com imunodeficiência, crianças menores de 6 meses de idade ou gestantes.²⁶

Devido à severidade dos possíveis efeitos colaterais, as autoridades de saúde evitam campanhas de vacinação em massa, sendo a vacina somente recomendada para moradores ou viajantes com destino às regiões endêmicas.²⁷⁻²⁸

Entretanto, durante surtos em regiões com baixa cobertura vacinal torna-se necessária a realização de campanhas de vacinação em massa, todavia, o estoque disponível e a velocidade de produção da vacina não são suficientes para produzir a quantidade necessária em um curto espaço de tempo, causando esgotamento do imunizante na maior parte das vezes, como ocorrido no Brasil e Angola em 2016.²⁹ Durante esse cenário, o fracionamento da vacina para um quinto da dose é uma das medidas mais adotadas para garantir uma maior cobertura vacinal possível

1.1.5 A busca por um tratamento

A vacinação e o controle do vetor são os únicos métodos para prevenir a febre amarela. Uma vez que a doença se manifesta, não existe nenhum medicamento específico para o tratamento da infecção e apenas métodos paliativos são utilizados para controlar os sintomas.³⁰ Por causa da severidade dos sintomas agudos, um tratamento específico para o vírus se faz necessário para garantir a proteção do grupo de risco em relação aos efeitos da vacina, além de ser uma ferramenta especialmente eficaz durante surtos, quando o esgotamento do imunizante pode acabar expondo diversas pessoas ao perigo de infecção.³¹

A maioria dos estudos envolvendo febre amarela consiste no uso de reposicionamento de fármacos, quando medicamentos já aprovados são avaliados como possíveis inibidores do YFV.³² Os análogos de nucleotídeos são os mais estudados, com diferentes resultados comprovando a eficácia da ribavirina,³³ sofosbuvir,³⁴ galidesivir³⁵ e favipiravir³⁶ em conter as infecções virais tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*. Apesar disso, apenas galidesivir e sofosbuvir encontram-se em fase de testes clínicos, uma vez que a ribavirina e o favipiravir mostraram-se ineficazes em estudos com modelos de primatas não-humanos.³¹ Como os surtos de febre amarela são periódicos e imprevisíveis, seus testes clínicos são de difícil execução, o resultado mais recente foi o tratamento compassivo com sofosbuvir em duas pacientes apresentando o estágio severo da doença.

Embora a carga viral e os sintomas tenham diminuído ao longo do tratamento, a falta de um placebo dificulta a conclusão do ensaio. Apesar disso, os resultados são promissores para continuar o estudo do sofosbuvir como um tratamento efetivo para febre amarela.³⁷

1.1.6 O ressurgimento da febre amarela no Brasil e no mundo

Desde o último caso urbano da doença em 1942, a maioria dos novos casos de febre amarela no Brasil ocorria em áreas endêmicas próximas à região amazônica. Logo, a vacinação só era indicada para quem vivesse ou viajasse para essas determinadas áreas. A partir do ano 2000 o vírus começou a circular nas regiões centro-oeste, sul e sudeste, causando surtos em Minas Gerais e Rio Grande do Sul entre os anos de 2002 e 2003, e nos estados de Tocantins, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná de 2007 a 2009 (Figura 2).³⁸

Com o aumento da população não vacinada na última década e a ocorrência de surtos em regiões consideradas não endêmicas, aumentaram os riscos de uma reurbanização da doença. O perigo ficou mais evidente a partir de 2016, quando o país entrou em um dos seus maiores surtos silvestres dos últimos 70 anos. Em menos de um ano, o vírus começou a circular entre os três estados mais populosos do Brasil nos quais a cobertura vacinal era baixa, aumentando os riscos de casos urbanos em cidades como Rio de Janeiro e São Paulo.³⁹

Como comparação, de 1980 a 2015 o número de casos humanos confirmados foi de 789, enquanto de 2016 até junho de 2020 foram confirmados mais de 2200 casos com 773 óbitos.⁴⁰ Para controlar os surtos, campanhas de vacinação em massa foram realizadas, contudo, por causa do baixo estoque disponível do imunizante, foi necessário utilizar o fracionamento da dose para garantir a vacinação de mais de 45 milhões de brasileiros entre 2016 e 2018.

Apesar do número de casos humanos ter reduzido após 2018, é importante ressaltar que por seis anos consecutivos a presença do vírus tem sido verificada a partir de epizootias em primatas não-humanos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, indicando a permanência do vírus em regiões extra-amazônicas próximas aos grandes centros urbanos.⁴⁰

Figura 2 - A) Mudança na circulação do YFV no Brasil durante os últimos 26 anos. B) Número de casos e taxa de letalidade da febre amarela registrados no Brasil.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante o ressurgimento da febre amarela no Brasil um cenário semelhante ocorreu no continente africano. Antes de 2016, os surtos no continente concentravam-se nas regiões Oeste e Leste responsáveis por 90% dos casos de febre amarela no mundo. No entanto, em dezembro de 2015, novos casos começaram a surgir em Luanda, capital da Angola, região com baixa circulação do vírus e baixa cobertura vacinal. O maior surto, após 30 anos sem ocorrências, logo se espalhou por todo o país, atingindo países vizinhos como República Democrática do Congo e o Quênia, além de exportar 11 casos para a China, tendo sido o primeiro relato de febre amarela no continente asiático.⁴¹⁻⁴²

Assim como no Brasil, os surtos no continente africano apontaram para o ressurgimento da febre amarela em regiões de baixa circulação viral próximas a grandes centros urbanos, deixando diversas regiões com alta densidade populacional, baixa cobertura vacinal e com a presença do vetor *A aegypti*, expostas a uma doença negligenciada com taxa de letalidade que varia de 30 a 60%.

A falta de vacinas e o baixo monitoramento durante surtos, além dos altos riscos de reurbanização, mudança epidemiológica do vírus e uma possível exportação para o continente asiático, levaram à criação de uma iniciativa para eliminar os surtos de febre amarela até 2026 pela OMS. A *Eliminate Yellow fever Epidemics* tem como principais objetivos proteger a população em risco, prevenir a propagação internacional e conter surtos rapidamente. Para cumprir os objetivos, a organização pretende fortalecer o monitoramento para detectar antecipadamente novos casos, aumentar medidas de controle do vetor, além de garantir fácil acesso à vacina durante surtos, estimando mais de 1.38 bilhões de pessoas vacinadas até 2026.⁴³

1.2 O vírus da febre amarela

O vírus da febre amarela foi a espécie-tipo para a designação da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, cujo nome vem do latim *flavus* (amarelo). Portanto, diversas características biológicas são homólogas as de vírus do mesmo gênero como, por exemplo, o vírus da Dengue (*Dengue Virus – DENV*) e o vírus da Zika (*Zika Virus – ZIKV*). Uma dessas características é o seu genoma, que consiste em uma fita simples de RNA sentido positivo (+ssRNA), com aproximadamente 11.000 bases. Essa fita possui duas regiões não codificadoras nas extremidades 5' e 3', e uma região que codifica uma grande poliproteína formada por 10 proteínas distintas: três proteínas estruturais, chamadas capsídeo (C), precursor de membrana (prM) e envelope (E), além de outras sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). As sete proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação do genoma viral.⁴⁴ As proteínas estruturais, por sua vez, têm como função a montagem do capsídeo viral.

Figura 3 - Organização estrutural dos flavivírus. O RNA genômico dos flavivírus codifica dez proteínas, sendo três estruturais e sete não-estruturais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O ciclo de infecção inicia-se com a entrada do vírus nas células pelo sistema de endocitose mediado por clatrina, através de interações da proteína E com receptores celulares ainda não conhecidos. Uma vez liberado no citosol, o material genético é traduzido em uma poliproteína que é clivada em 10 proteínas maduras; a clivagem é realizada pela protease viral NS2B-NS3 e por proteases celulares. As proteínas não-estruturais se organizam em um complexo de replicação no lúmen do retículo endoplasmático, onde a proteína NS5 polimerase interage com a regiões 5' não codificadoras do RNA viral e inicia a síntese de uma fita de RNA senso negativo (-ssRNA), etapa em que se forma o RNA dupla-fita que servirá de molde para as subsequentes passagens pelo complexo de replicação para a produção de novas cópias do genoma viral +ssRNA. As fitas complementares são separadas pela NS3 helicase liberando o -ssRNA, que é então utilizado como molde para a síntese de novas cópias do genoma viral +ssRNA. As fitas de RNA sofrem mudanças pós-transcricionais na região 5' pela proteína NS5 metiltransferase, tornando o RNA apto a ser traduzido pela maquinaria celular. Finalmente, o +ssRNA interage com as proteínas estruturais montando novas partículas virais, que são liberadas pelo complexo de golgi, concluindo o ciclo de replicação viral.⁴⁵

1.3 NS5 RNA polimerase RNA-dependente – Estrutura e Função

A proteína NS5 é a maior e mais importante proteína viral, com cerca de 103 kDa, ela é formada por dois domínios que possuem atividades independentes: um C-terminal RNA polimerase RNA-dependente (RdRp), que realiza a replicação do RNA viral, e um N-terminal metiltransferase, que tem como função a metilação do RNA.⁴⁶

Como a maioria das polimerases, a RdRp catalisa a reação de ligação entre os grupos 3'OH e 5'-alfa-fosfato de dois nucleotídeos em uma reação dependente de metais divalentes. Uma característica dessa enzima é o seu mecanismo de iniciação *de novo*, pelo qual ela é capaz de sintetizar seu próprio iniciador, excluindo a necessidade de um iniciador externo, como observado em polimerases dependentes de iniciadores.⁴⁷

Para garantir a iniciação *de novo*, a RdRp possui uma estrutura com a presença de motivos estruturais comuns a diferentes polimerases, assim como algumas regiões estruturais únicas.⁴⁸ De modo geral, a estrutura pode ser dividida nos subdomínios: dedão, dedos, palma, túnel de RNA, túnel de entrada dos NTPs, *priming loop* e sítio ativo (Figura 4A). Diferente de outras polimerases, o sítio ativo dessa proteína é cercado por longos elementos estruturais conectando as regiões dedo e dedão, resultando em um formato mais circular e compacto que restringe as suas mudanças conformacionais.⁴⁹

Dentre os subdomínios, podemos destacar 7 motivos estruturais conservados em diferentes polimerases, cada um desempenhando um papel importante para a atividade enzimática: coordenação dos metais divalentes que catalisam a reação (motivos A e C), estabilização e direcionamento da fita molde e produto (F, G e E), reconhecimento e estabilização dos NTPs (B e F), e liberação e neutralização do pirofosfato (D) (Figura 4B).^{48,50}

Figura 4 - A) Estrutura do domínio RdRp da YFV. PDB (6QSN). B) Motivos estruturais conservados em diferentes RdRp e resíduos importantes do sítio ativo: coordenação dos metais (D668, D667 e D535), reconhecimento e estabilização do NTP (N612, S603, D540, R473) e interação com as bases da fita molde (Y477 e I475). Legenda de cores: Motivo A (Amarelo), B (Laranja), Motivo C (Vermelho), Motivo D (Ciano), Motivo E (Azul), Motivo F (Verde), Motivo G (Roxo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além dos motivos estruturais, as RdRps de flavivírus apresentam uma região distinta da maioria de outras polimerases – o *priming loop* –, que se encontra no subdomínio do dedão e é imprescindível para o mecanismo de iniciação *de novo*.⁵¹ Durante as etapas de ligação e iniciação ele se encontra totalmente fechado bloqueando o túnel de saída do RNA. Essa restrição facilita a interação da fita de RNA molde com os dois nucleotídeos que formarão o iniciador.⁵² Finalizada a etapa de iniciação, o *loop* sofre uma mudança conformacional que desbloqueia o túnel de saída, permitindo a translocação da fita para a etapa de elongação. Os motivos estruturais, em conjunto com o *priming loop*, correspondem às regiões estruturais mais importantes para a atividade, as outras regiões da estrutura possuem como função manter estável esses motivos ou realizar interações com outras proteínas/regiões do RNA viral.

O mecanismo de ação da RdRp pode ser dividido em três etapas principais: ligação, iniciação e elongação, sendo a iniciação a mais limitante do processo.⁵⁰ Na etapa de ligação, ocorre a associação e dissociação da região 3' da fita de RNA molde até que ela atinja uma conformação ótima para a inserção de novos nucleotídeos. Com a fita inserida ocorre a etapa de iniciação, quando um iniciador complementar às primeiras duas bases da fita é sintetizado, no caso do YFV, um pppAG.⁵² Sintetizado o iniciador, a enzima passa para a etapa de elongação quando ocorre a extensão da fita de RNA até a finalização do processo. Entretanto, exclusivamente em ensaios *in vitro*, a enzima também é capaz de alongar fitas de RNA que se auto enovelam formando grampos nas regiões 3'. A presença do grampo tem como função simular um iniciador, portanto, nessas condições, a iniciação não ocorre e a reação pode ser resumida nas etapas de ligação e elongação.⁵³

Figura 5 – Formação da ligação fosfodiéster pela RdRp. A) Esquema da reação de formação da ligação fosfodiéster realizada pela RdRp. B) Esquema da catálise da reação pela coordenação de metais (A e B) em RNA polimerases. C) Estrutura cristalográfica da RdRp do vírus da Hepatite C (HCV) em complexo com RNA e UDP (PDB:4WTA).

Fonte: Adaptada de NG⁵⁴; PICARAZZI⁵⁵.

A formação da ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos catalisada pela RdRp segue um mecanismo comum a RNA polimerases, no qual o grupo 3'OH da fita nascente reage com o 5'-α-fosfato da base a ser incorporada (Figura 5A).⁵⁴ Para garantir a reação, o mecanismo envolve dois metais divalentes que são coordenados por aspartatos conservados em polimerases.

O metal A interage principalmente com o grupo 3'OH da fita e 5'-α-fosfato da base, enquanto o metal B interage com os grupos fosfatos 5'β e γ, permitindo a estabilização do sistema para ocorrer a reação. O metal A reduz a afinidade do hidrogênio no grupo 3'OH, facilitando o ataque ao 5'-α-fosfato da base a ser incorporada. O estado transiente é então estabilizado por ambos os metais até ocorrer a formação do pirofosfato, que em seguida é liberado do sítio com auxílio do metal B (Figura 5B).⁵⁶

No caso dos vírus da família *Flaviviridae*, magnésio ou manganês são usados como metais. A coordenação é realizada por três aspartatos localizados nos motivos A e C, sendo dois deles conservados em diferentes polimerases (Figura 5C).⁴⁸ Na RdRp de YFV estão presentes os três aspartatos envolvidos na coordenação 535, 667 e 668.⁵⁷ Dada a relevância do mecanismo para a atividade enzimática, os motivos estruturais A e C são os mais conservados em estruturas de polimerases.⁵⁸

1.4 A RNA polimerase RNA-dependente como alvo para a busca de antivirais

Devido à importância da RdRp para a replicação viral e a sua alta conservação entre os diferentes flavivírus, ela se torna um dos principais alvos na busca de novos antivirais.^{55,59} As principais classes de compostos estudados são os análogos ou não-análogos de nucleosídeos. O primeiro grupo consiste em moléculas semelhantes a nucleosídeos que podem ser incorporados na fita nascente de RNA pela competição com o substrato, levando à terminação imediata ou tardia da cadeia. A maioria dos estudos envolve o reposicionamento de antivirais já aprovados ou investigados contra outros vírus, como por exemplo o sofosbuvir e remdesivir, que apresentaram inibição contra as RdRp de DENV, ZIKV, YFV e WNV.^{34,60-63}

Os não-análogos de nucleosídeos por sua vez são inibidores não competitivos que se ligam a sítios alostéricos da proteína, impedindo mudanças conformacionais necessárias para a atividade enzimática. Durante os últimos dois anos, diversas estruturas cristalográficas de RdRp de diferentes flavivírus em complexos com ligantes foram determinadas, abrindo novos caminhos para a descoberta e otimização de fármacos baseados na estrutura do receptor, uma vez que poucos sítios de ligação eram conhecidos para essa proteína. Como exemplo pode-se destacar a descoberta de dois sítios alostéricos por meio da triagem por fragmentos,⁶⁴⁻⁶⁵ além de compostos que interagem com diferentes regiões do túnel de RNA.⁶⁶ Apesar do aumento no número de estruturas, a maioria dos inibidores encontrados é avaliada apenas em DENV e ZIKV, com poucos estudos em busca de inibidores para essa proteína em outros flavivírus como YFV por exemplo.

1.5 Descoberta de novos antivirais para vírus emergentes

O aumento no número de epidemias de novos vírus emergentes nos últimos 20 anos, chamou atenção por evidenciar os desafios existentes no controle e combate de surtos locais ou mundiais.⁶⁷ Durante surtos de novos vírus, vacinas e reposicionamento de fármacos são as principais ferramentas utilizadas para iniciar a busca por um tratamento.⁶⁸ Quando nenhuma dessas alternativas é capaz de providenciar uma resposta a curto ou médio prazo, fica evidente a necessidade da descoberta de novos antivirais.⁶⁹⁻⁷⁰

A maior parte dos antivirais aprovados ou investigados até o momento foi desenvolvida apenas contra determinados tipos de vírus, porém alguns deles acabam também sendo ativos contra outros alvos, como no caso mais recente do análogo de nucleosídeo remdesivir.⁷¹ Desenvolvido inicialmente para o tratamento de Hepatite C, o fármaco foi descoberto como um tratamento para Ebola e atualmente mostrou-se ativo contra polimerases de diversas famílias, como *Coronaviridae* e *Flaviviridae*, destacando que a busca de novos antivirais para alvos específicos é também de extrema importância no combate às novas epidemias.^{63,72}

2 OBJETIVOS

Esse projeto tem como propósito a busca de novos candidatos a antivirais para a enzima NS5 RdRp do YFV. Para tanto, buscou-se padronizar a produção da forma recombinante ativa dessa enzima em sistema de leveduras. Além disso, ensaios de alongação foram padronizados para que se possibilitasse a identificação de novos inibidores da RdRp de YFV. Por fim, buscou-se a caracterização estrutural dos complexos proteína-ligante a fim de compreender as relações entre estrutura e função dessas moléculas. Este trabalho oferece a possibilidade de contribuir para o desenvolvimento de um tratamento para a febre amarela e diferentes infecções por flavivírus, além de contribuir para a busca de antivirais específicos para RdRp.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonagem e Produção da forma recombinante ativa da RdRp de YFV
- Cristalização
- Padronização do ensaio de atividade
- Triagem de inibidores
- Determinação da potência inibitória

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aquisição dos genes do vírus da febre amarela

A linhagem circulante do YFV no Brasil em 2017 foi descrita pela pesquisadora Dr^a Myrna C. Bonaldo do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil.⁷³ Essa sequência está depositada no GenBank sob o código KY885001.1, e serviu como base para este trabalho. Os *amplicons* contendo a sequência da proteína NS5 (3,312 bases) foram gentilmente cedidos pela Dr^a. Myrna, e foram utilizados como moldes para a amplificação da região codificante do domínio RdRp da NS5 (Figura 6).

Figura 6 - Amplicons contendo as sequências codificantes das proteínas NS3 (amostras 1 e 2) e NS5 (amostras 3 e 4). Em 6, os marcadores de peso molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Clonagem da enzima RdRp no vetor de expressão em levedura

O vetor pBEVY-GU (Addgene 51229) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. André Luís Ambrósio (Universidade de São Paulo, São Carlos).

O plasmídeo pBEVY-GU é um vetor de leveduras episomal, ou seja, devido à presença de uma origem de replicação, ele não necessita ser integrado ao genoma do organismo para ser replicado, portanto, age de modo semelhante aos vetores bacterianos.⁷⁴ Além disso, ele também é um *shuttle vector* permitindo a sua manipulação e propagação em bactérias, facilitando a clonagem.⁷⁵ A indução da expressão é garantida pelo promotor divergente GAL 1,10, um dos promotores mais tradicionais em expressão heteróloga em leveduras, que garante alta indução ou inibição na presença de galactose ou glicose, respectivamente.⁷⁴ Para aumentar a estabilidade e facilitar a purificação da proteína de interesse, o pBEVY-GU contém a sequência codificante da GFP seguida de uma cauda de deca-histidina na porção C-terminal. O vetor possui também um gene URA3, responsável pela síntese de uracila e utilizado para a seleção de células transformadas. A seleção é realizada através do cultivo em meio de cultura com deficiência nessa base nitrogenada.

A sequência codificante do domínio RdRp, 8396-10347 (GB KY885001.1), foi amplificada a partir dos *amplicons* de YFV contendo a NS5, utilizando a enzima FastPol (Cellco) e *primers* contendo os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição XmaI (5' CCCGGG 3') e EcoRI (5' GAATTC 3'). Os *primers* utilizados para a amplificação foram Fw-5'-AAGGAGAAAAACCCGGGATGGAAGCCGATGTCATCC-3' e Rv- 5'-GAATTCGAGCTCACCGG-3'. O produto de PCR e o vetor pBEVY-GU foram tratados com as enzimas de restrição XmaI (NEB, USA) e EcoRI (NEB, USA) e posteriormente ligados com a adição de T4 Ligase (Cellco), produzindo o vetor pBEVY^{YFV_RdRp}.

O plasmídeo apresenta um sítio de clivagem da HRV-3C protease entre a proteína de fusão e a proteína clonada. Durante o desenvolvimento do projeto encontrou-se desafios na clivagem da proteína de fusão utilizando a enzima HRV-3C protease. Portanto, o vetor pBEVY^{YFV_RdRp} foi modificado para a inclusão do sítio de clivagem da protease do Vírus do mosaico do tabaco (TEV), através do método de *Gibson assembly*,⁷⁶ utilizando os *primers* Fw 5' GAGAATCTTTATTTTCAGGGCTTCAGCAAAGGAGAAGAACTTTTC 3' e Rv – 5' CCCGGGTTTTTCTCCTT 3'. Esse processo produziu o vetor pBEVY^{YFV_RdRp-TEV} (Figura 7), que foi utilizado ao longo do projeto.

Figura 7 - Mapa do vetor pBEVY^{YFV}-RdRp-TEV utilizado nesse trabalho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A fim de serem propagados, os vetores foram transformados em bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α . Em seguida, as células transformadas foram incubadas a 37 °C e 200 RPM por 16h em 5 ml de meio LB, posteriormente, o vetor foi extraído e purificado usando o *kit* comercial PureYield™ Plasmid Miniprep System (Cellco). A clonagem foi verificada por PCR de colônia e confirmada por sequenciamento.

3.3 Transformação em leveduras

Para as etapas de transformação e expressão em larga escala, foi utilizado o meio SD-URA, composto da base URA (450 ml) suplementada com solução SD 10X (50 ml) e glicose (2% para pré-inóculo e propagação ou 0.1% para expressão de proteínas). A composição de cada solução está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das soluções utilizadas para a produção do meio SD-URA.

SD 10X (1 L)		URA 2% glicose (200 ml)		URA 0.1% glicose (450 ml)	
Alanina	0.1 g	Base nitrogenadas de	1,34 g	Base nitrogenadas	3,35 g
Arginina	0.2 g	levedura sem		de levedura sem	
Histidina	0.5 g	aminoácidos		aminoácidos	
Isoleucina	0.8 g				
Leucina	1.0 g	Sulfato de amônio	1,0 g	Sulfato de amônio	2,5 g
Lisina	1.0 g				
Metionina	0.5 g	Glicose	4,0 g	Glicose	0,5 g
Fenilalanina	0.5 g				
Triptofano	1.0 g				
Tirosina	0.6 g				

Fonte: Elaborada pelo autor.

O plasmídeo contendo o fragmento de interesse foi utilizado para transformar células de uma linhagem mutante de *Saccharomyces cerevisiae* com deleção tripla (JRY2242, *mpc1Δmpc2Δmpc3Δ*, *his3 lys2 met15 trp1 ura3*).⁷⁷ A transformação foi realizada seguindo o protocolo de Gietz e Schiestl.⁷⁸

Resumidamente, uma colônia da linhagem mutante foi inoculada em 100 ml de meio de cultura YPD e cultivada por 16 h a 200 RPM, 30 °C. Posteriormente, 50 ml do inóculo foram centrifugados a 4.000g por 10 min a 4 °C e as células coletadas ressuspensas em 25 ml de água a 4 °C. O processo de centrifugação foi repetido duas vezes, sendo que na primeira as células foram ressuspensas em 1 ml de acetato de lítio à 100 mM, enquanto na segunda em 0,4 ml da mesma solução. Em seguida, 50 µl da solução de células em acetato de lítio foram ressuspensas em 240 µl de 50% (m/v) PEG 3.350 e adicionadas a 25 µl de espermatozoides de salmão a 2 mg. ml⁻¹.

Para finalizar, 50 µl do pBEVY^{YFV_RdRp-TEV} a uma concentração de 1 µg, foram adicionados a esta mistura celular e incubados a 42 °C por 45 min. As células foram então centrifugadas por 30 s a 8000g e ressuspensas em 100 µl de água esterilizada. As células transformadas foram plaqueadas em meio ágar auxotrófico SD-URA 2% glicose e incubadas por 2 dias a 30 °C para a seleção daquelas que adquiriram o plasmídeo. As colônias celulares obtidas foram então plaqueadas mensalmente em meio auxotrófico ágar SD-URA 2% glicose para garantir a sua propagação e manutenção.

3.4 Expressão em larga escala

A expressão em larga escala pode ser dividida em duas etapas principais: crescimento celular e expressão. No crescimento celular as linhagens transformadas são mantidas em condições de ótimo crescimento, a fim de aumentar o número de células para a etapa de expressão. Atingido o número ideal de células, adiciona-se o agente indutor para iniciar a expressão da proteína, utilizando agora condições ótimas de expressão.

Para iniciar a expressão em larga escala, as células transformadas foram cultivadas em um pré-inóculo contendo 200 ml de meio de cultura SD-URA 2% glicose a 30 °C e agitação de 250 RPM por 16 h. Para iniciar o crescimento celular, 500 ml de meio de cultura SD-URA 0.1% glicose, foram inoculados com a adição de 5 ml de pré-inóculo (Tabela 1). A cultura foi incubada a 30 °C com agitação de 250 RPM até atingir uma O.D₆₀₀ de 0,6. Posteriormente, a expressão da proteína foi induzida com a adição de 50 ml de solução galactose 20% (m/v), mantendo as células na mesma temperatura e agitação durante 16 h. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação à 4 °C, em uma rotação de 3.500 g durante 30 min (Sorvall RC5C+). As células coletadas foram então ressuspensas em 300 ml de tampão de lise (50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 10% Glicerina, 1 tablete do cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (SigmaAldrich)), e armazenadas em refrigeração a -80 °C para a etapa de purificação.

3.5 Purificação da RdRp de YFV

Para a purificação da RdRp de YFV, as células coletadas foram lisadas em um homogeneizador, utilizando a pressão de 750 bar por 30 min a 4 °C. O lisado foi então centrifugado a 12.500 g por 60 min (SORVALL RC6 Plus).

A fração solúvel do material clarificado foi utilizada para a etapa de cromatografia de afinidade por níquel. A solução foi injetada em uma coluna HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% Glicerol).

Após a passagem do clarificado, foi realizada a lavagem com 10 volumes de coluna (VC) de tampão A, seguido de três etapas de lavagem de 10 VC utilizando 20 e 30% de Tampão B (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% Glicerol, 300 mM de imidazol). Após a lavagem, a eluição foi realizada com 5 VC de Tampão B.

À proteína coletada foram adicionados 0,1 mg/ml de TEV e 4 mM de DTT e posteriormente a solução foi mantida em diálise a 4 °C, por 16 h, em 1 L de Tampão A. Após a diálise, uma segunda etapa de cromatografia de afinidade por níquel foi utilizada para separar a proteína de fusão, com a diferença que nesse caso a proteína de interesse foi coletada logo na primeira passagem. Para finalizar a purificação, foi realizada uma etapa de cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna HiLoad Superdex 75 prep grade 16/60 (GE Healthcare) pré-equilibrada com Tampão C (20 mM Tris pH 7,5, 1,0 M NaCl, 0,5 mM TCEP, 5% Glicerol). A concentração de proteína foi determinada no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher) a partir do coeficiente de extinção teórico de $158.415 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a 280 nm, calculado pelo ProtParam.⁷⁹ A pureza da proteína foi confirmada por SDS-PAGE.

3.6 Cristalização, *seeding* e coleta de dados.

Os ensaios de cristalização foram realizados utilizando o método de difusão de vapor. Nesse método, uma gota formada por proteína e solução de cristalização contendo algum agente precipitante é selada em um reservatório com um volume maior de solução. Devido à diferença de concentração entre a gota e a solução do reservatório, uma difusão de vapor ocorre no sentido gota-solução, aumentando as concentrações da proteína e do precipitante (Figura 8A). Inicialmente esse sistema se encontra em uma região insaturada no diagrama de fases, e à medida que a difusão de vapor ocorre, o sistema passa a atingir regiões favoráveis para a geração espontânea de núcleos cristalinos de proteína, permitindo a formação de cristais. Conforme eles crescem, a solução saturada perde proteína e o sistema passa a atingir regiões metaestáveis. Durante a região metaestável, os cristais aumentam de tamanho até entrarem em equilíbrio com a solução de proteína saturada, finalizando o processo de cristalização (Figura 8B).

Dependendo das condições o sistema pode atingir a região de precipitação ao invés da metaestável, inviabilizando o crescimento de cristais e levando a proteína à precipitação.

Figura 8 - Método de difusão de vapor A) Uma gota contendo solução de cristalização e proteína é selada em um reservatório com um alto volume de solução de cristalização em relação à gota. A diferença de concentração entre a gota e solução gera uma troca de vapor no sentido gota-solução. B) Esquema de um diagrama de cristalização do método de difusão de vapor. Círculo aberto- Condição inicial. Quadrado Preto – Núcleo cristalino, Estrela – Cristal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Diferentes *kits* comerciais foram utilizados para os ensaios de cristalização, como os *kits* Morpheus, INDEX, BCS, SALTRX, JCSG, Crystal Screen I, TOP96, dentre outros. A técnica utilizada para promover a cristalização foi o *sitting drop*, com o auxílio de um robô de cristalização *Crystal Gryphon* (ARI®) para dispensar a proteína e solução de cristalização. Os ensaios foram realizados com 200 nl de solução proteica e um volume equivalente de reservatório, equilibrado contra 40 µl de reservatório à 18 °C. A concentração da proteína utilizada foi de aproximadamente 5.0 mg.ml⁻¹ e as caixas de cristalização foram mantidas a 18 ou 4 °C.

Ensaio de cristalização com expansões de condições específicas foram executados utilizando os métodos de *hanging* ou *sitting drop* em placas com 24 poços. A fim de facilitar a cristalização, realizou-se ensaios com *seeding* de condições com pequenos cristais de proteína. O *seeding* foi preparado diluindo a gota de cristalização 100x na solução do reservatório. A solução foi então *vortexada* por 1 minuto junto a 3 microesferas de vidro. O *seeding* foi adicionado diretamente à gota de cristalização durante os ensaios de expansão a uma proporção de 10% do volume total da gota.

Quando necessário, os cristais foram inseridos em uma solução crio-protetora de 10% etilenoglicol. Os cristais obtidos foram então armazenados em um Uni-Puck para a coleta que foi realizada na linha de luz síncrotron MX-I24 no Diamond Light Source (Oxfordshire, Reino Unido).

3.7 Padronização do ensaio de alongação da RdRp acoplado à fosfatase alcalina

Para todos os ensaios de atividade, utilizou-se o RNA sintético 3'UTR-U₃₀ (5'-biotin-U₃₀-ACUGGAGAUCGAUCUCCAGU-3') sintetizado pela empresa Dharmacon. A presença da sequência 3'UTR tem como intuito gerar uma alça que age como um iniciador; consequentemente, o mecanismo de iniciação *de novo* não ocorre e a reação pode ser resumida nas etapas de ligação e alongação.

Os ensaios de alongação acoplados à fosfatase alcalina (*Fluorescence-based alkaline phosphatase-coupled polymerase assay*, ou FAPA) foram adaptados de Niyomrattanakit.⁸⁰ Nesse ensaio, a atividade de alongação da fita de RNA 3'UTR-U₃₀ através do consumo da sonda BBT-ATP, é medida de maneira indireta por meio de uma reação acoplada com a fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIP). O BBT-ATP é uma adenosina trifosfato com uma sonda BBT presente no fosfato γ . A sonda só é capaz de emitir uma fluorescência após a remoção dos grupos fosfatos por uma fosfatase. Logo, após a alongação do RNA pela RdRp torna-se necessário adicionar uma fosfatase alcalina para desfosforilar o BBT e garantir uma leitura do produto formado durante a reação.

A RdRp sintetiza a fita complementar ao RNA molde através do consumo de BBT-ATP (Jena Bioscience) (Figura 9A). Durante esse processo, ocorre a liberação da forma pirofosfato da sonda BBT (BBT-PP_i) (Figura 9C). Após a reação, a enzima CIP é utilizada para desfosforilação do BBT+PP_i em BBT, que pode ser então detectado através da sua fluorescência, como esquematizado na Figura 9D.

Figura 9 - Modelo esquematizado dos ensaios de elongação FAPA. A) RdRp inicia a replicação de uma fita simples de RNA 3'UTR-U₃₀ usando BBT-ATP como substrato. B,C) Na medida em que a fita é transcrita, ocorre a liberação de BBT-PP_i. D) A enzima CIP é adicionada em tampão de parada, inativando a RdRp, e desfosforilando o BBT-PP_i para BBT e 2P_i. Uma vez liberado, o BBT passa a emitir um sinal de fluorescência proporcional à quantidade de BBT-PP_i formado na polimerização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Antes de cada ensaio de atividade, o RNA 3'UTR-U₃₀ foi incubado a 55 °C por 5 min em um termociclador PCR T100 (BioRad) para garantir a formação do grupo de RNA no 3'UTR.

As reações foram realizadas no tampão de ensaio (50 mM Tris pH 7, 1 mM MnCl₂, 0.01% Triton X-100) contendo 80 nM RdRp e 200 nM 3'UTR-U₃₀. Durante a padronização, foram testadas diferentes temperaturas e concentrações de BBT-ATP. A reação foi iniciada homogeneizando volumes iguais de proteína e substrato (RNA+BBT-ATP). Após o tempo desejado, a reação foi parada pela adição do tampão da CIP (200 mM NaCl, 25 mM MgCl₂, 1,5 M DEA pH 9) com 10 unidades de CIP (NewEngland Biolabs). Para garantir a conversão completa do BBT-PP_i em BBT, a reação foi incubada por 50 min a 30 °C em um termociclador. Soluções contendo BBT+RNA ou BBT+RdRp foram utilizadas como branco. A intensidade da fluorescência foi medida em uma placa Costar 96 poços de fundo branco nos comprimentos de onda λ_{ex} :422 nm / λ_{emi} :566 nm, no espectrofotômetro de placas Molecular Devices GEMINI.

A fim de evitar contaminação de RNAses todos os ensaios foram realizados dentro do fluxo laminar, com ponteiros com filtro, tubos e placas livres de RNase e todas as soluções foram preparadas em água tratada com DEPC 0.1%. As concentrações de BBT-ATP foram variadas de acordo com as necessidades de cada experimento.

3.8 Curva de Calibração BBT-ATP

A curva de calibração da sonda BBT foi realizada utilizando o kit AttoPhos® AP Fluorescent Substrate System (Promega), que contém a sonda BBT-PPi a uma concentração conhecida. Uma diluição seriada de fator dois foi realizada a partir de 500 nM em tampão de ensaio. Para cada diluição, a CIP foi adicionada em tampão de parada nas mesmas proporções e concentrações do ensaio de atividade. A intensidade da fluorescência foi medida durante 50 min em intervalos de 2 min em uma placa Costar 96 poços de fundo branco nos comprimentos de onda λ_{ex} :422 nm / λ_{emi} :566 nm no espectrofotômetro de placas Molecular Devices GEMINI.

A reta que correlaciona a fluorescência relativa de cada concentração de BBT-PPi foi obtida através do método de regressão linear utilizando o *software* OriginPro 9.0.

3.9 Padronização do ensaio de alongação da RdRp em tempo real

O ensaio alongação em tempo real (*real-time polymerase assay*, ou RTPA) foi adaptado do ensaio reportado por Álvarez.⁸¹ Nesse ensaio, a atividade de alongação de uma fita RNA 3'UTR-U₃₀ é medida diretamente utilizando a sonda SYBR Green I (Invitrogen) (SGI). O SGI é uma sonda intercalante que fluoresce com maior intensidade quando intercalada a duplas fitas de DNA ou RNA. Dessa forma, a atividade de alongação pode ser detectada diretamente pelo aumento da fluorescência durante a formação da fita complementar, como exemplificado na Figura 10.

Figura 10 - Modelo esquematizado do ensaio de alongação RTPA A) RdRp inicia a replicação de uma fita simples de RNA 3'UTR-U₃₀, usando ATP como substrato B, C) Na medida em que a fita é transcrita, o SGI intercala com as duplas fitas de RNA e passa a fluorescer com maior intensidade, gerando um sinal proporcional a quantidade de dupla fita formada durante a polimerização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os ensaios de RTPA, o RNA 3'UTR-U₃₀ foi incubado a 55 °C por 5 min em um termociclador PCR T100 (BioRad) para garantir a formação do grampo de RNA. As reações foram realizadas no tampão de RTPA (50 mM Tris pH 7, 1 mM MnCl₂, 0,01% TritonX-100, 1x SGI) e com variadas concentrações de proteína, ATP ou 3'UTR-U₃₀.

Para iniciar a reação, volumes iguais de proteína e substrato (3'UTR-U₃₀+ATP) foram homogeneizados em uma placa de PCR de 96 poços a um volume final de 50 µl. Uma solução contendo apenas 3'UTR-U₃₀ e ATP foi utilizada como branco. Em seguida, a placa foi incubada a 25 °C em um sistema de PCR em tempo real Mx3000P (Agilent). As intensidades da fluorescência do SGI foram avaliadas a cada 30 s com o uso do filtro FAM (λ_{ex} :462 nm / λ_{emi} :516 nm) até o tempo desejado.

3.10 Determinação das constantes de Michaelis-Menten

As constantes de Michaelis-Menten (K_m e V_{max}) foram determinadas para ambos os ensaios padronizados. Para o ensaio FAPA, essas constantes foram estabelecidas pela variação do substrato BBT-ATP; para o ensaio RTPA elas foram estipuladas tanto para a variação do 3'UTR-U₃₀ quanto para o ATP. As reações de cada ensaio foram preparadas como descrito nos itens 3.7 e 3.9, porém com concentração variada do substrato analisado.⁸²

A velocidade inicial (v_0) da reação foi determinada a partir do coeficiente angular das curvas de atividade pelo tempo durante o regime linear de cada ensaio. Os parâmetros cinéticos foram obtidos pela velocidade inicial de cada concentração de substrato através do ajuste de dados à equação de Michaelis-Menten. O *software* OriginPro 9 (OriginLab Corporation) foi utilizado para realizar o ajuste.

3.11 Triagem da biblioteca *Pandemic Response Box*

Uma das técnicas utilizadas para a busca por novos candidatos a fármacos é a triagem de inibidores.⁸³ Nessa técnica, bibliotecas de compostos escolhidos de maneira aleatória ou com algum viés para determinados grupos de compostos são triadas através de ensaios de inibição. A partir de ensaios em larga ou média escala, bibliotecas de diversos tamanhos podem ser utilizadas, garantindo uma ampla cobertura de espaço químico que aumenta a chance da descoberta de um novo candidato a fármaco.⁸³

O processo de triagem é realizado utilizando ensaios de inibição pontual em uma determinada concentração de composto. Aqueles que apresentam uma porcentagem de inibição acima de determinado valor são avaliados por ensaios dose-resposta.

Para a triagem inicial da biblioteca de compostos MMV/DNDi *Pandemic Response Box* (PRB), foram realizados ensaios pontuais na presença de uma concentração fixa dos compostos (20 μ M). Os ensaios de inibição foram executados com o ensaio de alongação direta RTPA, a uma concentração final de 80 nM RdRp, 100 nM 3'UTR-U₃₀ e 20 μ M ATP. Utilizou-se o mesmo protocolo, com a diferença que 0.5 μ l de ligante a uma concentração de 2 mM foi adicionado na proteína a um volume final de 25 μ l. A placa foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e em seguida, a reação foi iniciada com adição de 25 μ l de substrato (RNA+ATP). A reação com 1% de DMSO foi usada como controle e uma solução contendo apenas os substratos com 1% DMSO foi utilizada como branco. Como anteriormente, a placa foi incubada a 25 °C em um sistema de PCR em tempo real Mx3000P (Agilent) e as intensidades da fluorescência do SGI foram avaliadas a cada 30 s durante uma hora.

A qualidade do ensaio para triagem de compostos foi determinada pelo fator- Z^{84} , calculado a partir da seguinte equação:

$$Z - fator = \frac{3(\sigma_C + \sigma_B)}{|\mu_C - \mu_B|}$$

Os valores σ_C e σ_B são os desvios padrão da reação controle e branco respectivamente, enquanto μ_C e μ_B , a média da reação controle e branco respectivamente.

A porcentagem de inibição de cada composto testado foi definida pela seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 * (1 - \text{Atividade relativa}) = 100 * \left(1 - \frac{\text{Reação} - \text{Branco}}{\text{Controle} - \text{Branco}}\right)$$

Na qual, Reação, Branco e Controle são as intensidades da fluorescência de cada solução após 30 min. Compostos que apresentaram inibição superior a 80% foram selecionados para avaliação de sua potência inibitória.

3.12 Determinação do IC₅₀

Os compostos selecionados na etapa de triagem foram utilizados para a determinação da concentração inibitória média (IC₅₀), a qual foi determinada por curvas do tipo dose-resposta. Esses experimentos foram realizados pelo ensaio RTPA nas mesmas condições descritas no ensaio de triagem (item 3.11), porém com concentrações variadas dos compostos testados.

As curvas dose-resposta foram obtidas através do ajuste dos dados ao modelo de Hill 1 (OriginPro 9.0). A concentração inibitória média (IC₅₀) foi então determinada pela interpolação dos dados da curva gerada.

3.13 Ensaio de interferência

Para determinar a possível interação dos compostos com o SGI, realizou-se um ensaio de interferência incubando o composto com 3'UTR-U₃₀. 0,5 uL de composto a 2 mM foram adicionados em 49,5 µl de tampão de ensaio (50 mM Tris pH 7, 1 mM MnCl₂, 0,01% TritonX-100, 1x SGI) com 100 nM 3'UTR-U₃₀ em. Uma solução contendo 3'UTR-U₃₀ em tampão de ensaio com 1% DMSO foi utilizada como controle, enquanto o tampão de ensaio com 1% DMSO foi utilizado como branco.

A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 min, e a fluorescência medida como descrito no item 3.9.

A interferência do composto com a sonda foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Interferência} = 100 * \left(1 - \frac{(3'UTR - U_{30} + \text{Composto}) - (\text{Branco})}{(3'UTR - U_{30}) - (\text{Branco})} \right)$$

Na qual (3'UTR-U₃₀ + Composto), (3'UTR-U₃₀) e (Branco) são as intensidades medidas para cada solução.

3.14 Ensaios de fluorimetria de varredura diferencial

A técnica de fluorimetria de varredura diferencial (DSF) permite medir a estabilidade de proteínas em diferentes condições químicas. Ela consiste em utilizar uma sonda que interage com as regiões hidrofóbicas da proteína e cuja fluorescência é extremamente extinguida na presença de água. As regiões hidrofóbicas são conhecidas por se localizarem internamente quando uma proteína está bem enovelada. Conforme a proteína é aquecida, as regiões hidrofóbicas se expõem e interagem com a sonda levando a um aumento na intensidade do sinal obtido. A partir do ponto de inflexão da curva de desnaturação, pode-se obter a temperatura de *melting* (T_m), considerada um parâmetro de estabilidade da proteína.

Os ensaios de DSF foram realizados a fim de avaliar a estabilidade da proteína quando na presença de diferentes compostos. Inicialmente, a sonda SYPRO Orange (Invitrogen) foi diluída para uma concentração final de 5x em uma solução contendo 3,0 μM de RdRp em Tampão C. Os ligantes foram adicionados à uma concentração de 15 μM em 25 μl de proteína, e 1,0 % de DMSO foi utilizado como controle. A placa foi incubada por 15 min e a fluorescência medida a cada minuto em um sistema de PCR em tempo real Mx3000P (Agilent) utilizando o filtro ROX (λ_{ex} :585 nm / λ_{emi} :610 nm). Variou-se a temperatura de 25 °C para 75 °C, com aumento de 1,0 °C a cada minuto.

As curvas de desnaturação foram obtidas através do ajuste de dados ao modelo de Boltzmann a partir do *software* OriginLab 9. O ponto de inflexão do ajuste obtido foi estabelecido como valor de T_m .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem e Expressão

A clonagem foi validada pela técnica de PCR de colônia e sequenciamento de DNA. A Figura 11 mostra o gel de eletroforese obtido a partir de um PCR da colônia de DH5- α transformada com o vetor pBEVY^{YFV}_RdRp-TEV. O fragmento clonado possui o mesmo tamanho do gene de interesse (1.930 pb), verificando o êxito da clonagem. O programa BioEdit⁸⁵ foi utilizado para gerar uma sequência de DNA a partir do sequenciamento obtido, que foi então alinhada com o genoma da linhagem atual (GenBank KY885001.1) pelo programa BLASTN 2.8.0+.⁸⁶ O alinhamento atingiu uma pontuação de 3472 bits e identidade de 99% com a região do domínio RdRp (8401 a 10348), confirmando o resultado da clonagem.

Figura 11 - Resultados da Clonagem - A) Gel eletroforese 1% agarose do PCR de colônia do vetor pBEVY^{YFV}_RdRp-TEV. Coluna 1 - Marcador Molecular Coluna 2 - PCR de Colônia. B) Imagem de microscopia de fluorescência de uma cultura de expressão da linhagem transformada com o vetor pBEVY^{YFV}_RdRp-TEV.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a expressão da proteína, o vetor clonado foi transformado em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com deleção tripla (JRY2242, *mpc1Δmpc2Δmpc3Δ*, *his3 lys2 met15 trp1 ura3*). Uma amostra da cultura de expressão foi preparada para microscopia de fluorescência e a presença da proteína averiguada pela emissão da GFP. Na Figura 11B podemos verificar que a GFP se encontra internalizada nas células em regiões isoladas, indicando uma expressão de proteína solúvel pelo organismo.

4.2 Purificação

Dado que a proteína apresenta uma cauda de fusão com GFP e Histidina, a purificação consistiu em três etapas: 1) primeira afinidade por níquel, para isolar a proteína do extrato celular; 2) segunda afinidade por níquel após a clivagem, para isolar a proteína sem a cauda de fusão e; 3) uma cromatografia de exclusão molecular.

Como podemos ver na Figura 12A, a presença de uma banda forte na região de 100kDa durante a eluição da primeira afinidade por níquel confirma que a proteína foi expressa corretamente pelo organismo e isolada do extrato celular. A clivagem e isolamento da proteína de fusão foi verificada a partir da amostra coletada na segunda afinidade (Figura 12C). A banda na região de 75 kDa confirma o êxito na etapa de clivagem, entretanto, a presença de impurezas após essa etapa realçou a necessidade da cromatografia de exclusão molecular.

A cromatografia de exclusão molecular isolou grande parte das impurezas, resultando em uma solução de proteína com um grau de pureza suficiente para ensaios de atividade e cristalização (Figura 12B). As frações 6 e 7 foram coletadas para os ensaios de cristalização, enquanto para a atividade, as frações de 5 a 7 foram utilizadas. O rendimento da expressão após todas as etapas de purificação foi de aproximadamente 1 mg/L.

Figura 12 - Resultados da purificação da RdRp. A) Gel de SDS-PAGE 12.5% M - Marcador molecular. 1- Passagem do extrato 2 – Fração solúvel do lisado 3 - Lavagem 10% Tampão B 4- Lavagem 20% Tampão B 5- Eluição B) Cromatograma da exclusão molecular. C) Gel SDS-PAGE 12.5% 1- Fração coletada na segunda cromatografia de afinidade. 2-7 Frações coletadas na cromatografia de exclusão molecular de acordo com o cromatograma mostrado no item B.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Cristalização

Durante o desenvolvimento do projeto, houve problemas na clivagem da proteína de fusão GFP. As proteases utilizadas em nosso laboratório para a clivagem de proteínas de fusão são expressas e purificadas localmente, seguindo protocolos descritos na literatura, porém problemas na purificação da HRV 3C levaram a uma baixa quantidade de protease e ausência de clivagem da proteína de fusão.⁸⁷ Ensaios de cristalização foram então realizados com e sem a proteína fusionada à GFP. No entanto, somente foram obtidos cristais utilizando a proteína fusionada (Figura 13). Esses cristais cresceram em duas condições do kit de cristalização Morpheus (Molecular Dimensions) (Figura 13C). A garantia de serem cristais de proteína pôde ser facilmente verificada, uma vez que a presença da GFP garante uma coloração verde aos cristais.

Figura 13 - Resultados da cristalização da RdRp fusionada a GFP. A) Gel de SDS-PAGE 12.5% E-Eluição da cromatografia de afinidade 1-6 Frações da cromatografia de exclusão molecular. B) Cromatograma da exclusão molecular. C) Condições de cristalização que deram origem aos cristais da proteína. D) Imagem dos cristais obtidos na condição G3 do kit Morpheus. E) Padrão de difração de um dos cristais obtidos na condição G3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os cristais foram então enviados para a linha MX-I24 na fonte de luz síncrotron Diamond Light Source (Oxfordshire, Reino Unido), porém apresentaram baixa difração na região de 4 Å, não sendo possível obter um conjunto de dados capaz de resolver as estruturas. Para reproduzir os cristais, ensaios de cristalização foram realizados com expansões das condições através dos métodos de *sitting* ou *hanging drop*, porém, nenhum cristal foi obtido.

Os ensaios de cristalização com a proteína não fusionada não apresentaram cristais. A alta concentração de cloreto de sódio necessária para separar as impurezas na cromatografia de exclusão molecular pode interferir no processo de cristalização da proteína. O princípio dos ensaios de cristalização é a perturbação da proteína por diferentes soluções, que através de métodos como difusão por vapor podem levar à nucleação e cristalização da proteína. Quando a solução em que a proteína se encontra possui altas concentrações de sal ou agente tamponante, a perturbação pode ser interferida e, conseqüentemente, menos eventos de cristalização podem ocorrer.⁸⁸ Para garantir uma menor interferência, a concentração de sal na amostra de proteína após a cromatografia de exclusão molecular foi reduzida de 1 M para 150 mM

Os ensaios de cristalização subsequentes, resultaram em diversas condições apresentando microcristais (Figura 14), logo, diminuir a concentração de sal ajudou a proteína a alcançar a região de nucleação. A fim de otimizar a cristalização da proteína, o material cristalino obtido na condição A8 do kit AmSO₄ (QIAGEN) foi utilizado para criar uma solução estoque de *seeding*. A mesma condição foi então expandida em diferentes concentrações de sal e precipitante sob diferentes concentrações de proteína e *seeding*, porém, não foi possível obter nenhum cristal. Outros métodos podem ser empregados no futuro para tentar otimizar a cristalização, como por exemplo, a co-cristalização com os compostos que aumentaram a estabilidade de proteína.

Figura 14 - Gota de cristalização da condição A8 do kit AmS04. A) Imagem da gota. B) Imagem UV da gota.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Ensaios de atividade

Durante muito tempo a busca por novos antivirais utilizando ensaios específicos para polimerase virais esteve restrita pelos métodos disponíveis para avaliar a atividade enzimática. A maioria dos ensaios da literatura consistia no uso de nucleotídeos radioativos que, embora eficazes e sensíveis, diminuem a sua acessibilidade e dificultam o uso em ensaios de triagens em larga escala. Apenas a partir de 2007 e posteriormente em 2011, ensaios fluorescentes começaram a ser desenvolvidos como alternativas para medir a atividade da RdRp de flavivírus, com o uso de fitas de RNA com sondas⁸⁹ ou nucleotídeos quimicamente modificados.^{80,90} Apesar de sondas fluorescentes intercalantes de DNA/RNA terem sido descobertas e utilizadas há alguns anos, o seu uso para medir a atividade de RdRp virais é recente.^{65,81,91}

A fim de estabelecer uma plataforma de triagem e caracterização de inibidores para a RdRp de YFV, foi necessário padronizar ensaios de atividade para a proteína. Dois tipos de ensaios foram padronizados, um com reação acoplada à fosfatase alcalina utilizando nucleotídeos modificados e outro com medida direta utilizando a sonda intercalante SGI.

4.4.1 Ensaio de elongação da RdRp acoplado a fosfatase alcalina (FAPA)

O ensaio de elongação FAPA foi elaborado para RdRp de DENV por Niyomrattanakit⁸⁰ como uma alternativa aos ensaios comuns de polimerases envolvendo radiação. Nesse ensaio, a atividade de elongação da fita de RNA 3'UTR-U₃₀ utilizando o BBT-ATP como substrato é medida de maneira indireta por meio de uma reação acoplada com a fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIP) (Figura 9).

Com a finalidade de se obter uma relação entre o sinal de fluorescência e a concentração de BBT-PP_i formada durante o ensaio FAPA, uma curva de calibração foi calculada. Concentrações conhecidas de BBT-PP_i foram tratadas com a enzima CIP por 50 min. Os valores de fluorescência obtidos foram então relacionados com suas respectivas concentrações por meio de um gráfico. Como esperado, houve uma dependência linear entre a intensidade da fluorescência e a concentração de BBT-PP_i desfosforilada. Os pontos foram ajustados para uma reta utilizando regressão linear e uma equação foi obtida para transformar o sinal de fluorescência em concentração de BBT-PP_i (Figura 15).

Figura 15 - Curva de calibração do BBT-ATP. A) Gráfico da atividade pelo tempo da CIP em diferentes concentrações de BBT-PP_i. B) Ajuste linear dos valores de intensidade após 50 min de reação pela concentração de BBT-PP_i.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o intuito de verificar se a RdRp de YFV seria capaz de utilizar o BBT-ATP como substrato para as reações, duas temperaturas foram escolhidas: 37 °C e 25 °C. A reação foi realizada com 2 µM BBT-ATP e 200 nM 3'UTR-U₃₀ e finalizada a cada 20 min para obter o sinal de leitura. Como esperado, a proteína é capaz de utilizar o BBT-ATP como substrato apresentando uma atividade enzimática influenciada pela temperatura. Embora a leitura final para ambas as temperaturas tenha sido em torno de 60 RFU, a enzima apresentou uma atividade linear durante um longo período apenas a 25 °C, portanto, devido à estabilidade da proteína e sua atividade linear, essa temperatura foi escolhida para os próximos ensaios (Figura 16A).

Determinada a melhor temperatura do ensaio, o próximo passo foi variar a concentração de BBT-ATP para avaliar a mudança de comportamento e aumentar o sinal de fluorescência obtido. O BBT-ATP foi variado de 2 a 20 µM mantendo uma concentração fixa de 200 nM 3'UTR-U₃₀ e 80 nM de proteína. A curva de atividade pelo tempo atingiu intensidades mais elevadas conforme o aumento na concentração de BBT-ATP, porém, a inclinação do regime linear durante os 60 min de reação foi semelhante para as concentrações de 20 e 10 µM, indicando que a velocidade da reação atingiu o seu limite (Figura 16B). Para obter uma alta medida de fluorescência, a concentração de 20 µM foi utilizada nos próximos ensaios.

Figura 16 - Padronização do ensaio FAPA. A) Curvas de atividade pelo tempo para o ensaio FAPA em duas temperaturas diferentes. B) Curvas de atividade pelo tempo em diferentes concentrações de BBT-ATP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As constantes cinéticas de Michaelis-Menten foram obtidas a partir das curvas de diferentes concentrações de BBT-ATP e comparadas com os valores de K_m da literatura (Figura 17). O valor determinado é semelhante ao da RdRp de diferentes sorotipos de DENV reportado por Nyomrattanakit (Tabela 2).⁸⁰

Figura 17 - Ensaios de cinética enzimática da RdRp utilizando o ensaio FAPA. Valores da velocidade de reação pela concentração de BBT-ATP em reações contendo 80 nM RdRp e 200 nM 3'UTR-U₃₀. Os valores de intensidade foram convertidos para nM de BBT-PPi a partir da curva de calibração.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 - Comparação entre os valores de K_m do substrato BBT-ATP com dados da literatura.

	YFV	DENV	DENV2	DENV3	DENV4
K_m (μM)	$3,1 \pm 0,7$	9,39	5,18	4,90	1,68

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Ensaio de elongação da RdRp em tempo real (RTPA)

O ensaio de elongação RTPA foi elaborado com base no artigo de Álvarez.⁸¹ Nesse ensaio, são adicionadas sondas intercalantes à reação que detectam a formação da fita dupla de RNA durante a elongação (Figura 10). Os ensaios da literatura utilizam as sondas PicoGreen^{65,92} ou SYTO 9⁸¹ para esse fim. Nesse projeto, contudo, foi avaliado a utilização da sonda SGI para essa finalidade.

A Figura 18A mostra a curva de atividade pelo tempo obtida em um período de 2 h. Como esperado, houve um aumento da fluorescência ao longo do tempo com um padrão típico de cinética enzimática, mantendo um aumento linear durante os primeiros 30 min de reação. O resultado indica que o SGI foi capaz de se intercalar em duplas fitas de RNA sem impedir a atividade enzimática da RdRp. Ainda foi possível notar que a atividade enzimática se manteve por 2 h de reação, mostrando que a enzima foi estável e ativa por um longo período.

Figura 18 - Ensaio de elongação RTPA – A) Curva de atividade pelo tempo na presença de 1x SGI, 20 μ M ATP, 250 nM 3'UTR-U₃₀ e 80 nM RdRp. B) Gráfico de barras da intensidade do SGI após uma hora de reação com a sonda adicionada no início ou final do ensaio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificar como a atividade da proteína é afetada pela presença do SGI, duas reações foram realizadas. A primeira com a adição da sonda no começo da reação e a segunda apenas após o término. Ambas as reações foram paradas com 25 mM de EDTA para garantir a mesma medida de atividade.

A atividade da proteína na presença do SGI foi cerca de 18% menor quando comparado à reação sem a sonda (Figura 18B). Portanto, embora o ensaio RTPA seja prático, deve ser levado em consideração que os parâmetros cinéticos e o perfil de atividade são diferentes de um cenário real. Logo, o SGI, assim como as outras sondas, também pôde ser utilizado sem causar grande interferência na atividade da proteína.

Figura 19 - Padronização do ensaio de elongação RTPA A) Curva de atividade pelo tempo em diferentes concentrações de 3'UTR-U₃₀ com concentração fixa de RdRp (80 nM) e ATP (20 μM). B) Curva de atividade pelo tempo em diferentes concentrações de ATP, com concentração fixa de RdRp (80 nM) e 3'UTR-U₃₀ (100 nM). C) Curva de atividade pelo tempo em diferentes concentrações de RdRp, concentração de ATP e 3'UTR-U₃₀ fixas em 20 μM e 100 nM respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As concentrações de substrato e proteína foram otimizadas a partir de uma diluição em série de fator 2 com início em 250 nM 3'UTR-U₃₀, 266 μ M ATP ou 320 nM RdRp. A Figura 19 mostra as curvas obtidas.

O período de atividade linear manteve-se por 30 min com inclinações proporcionais às diferentes concentrações dos substratos, como esperado de um comportamento enzimático. Foi possível verificar que nas maiores concentrações testadas a enzima atingiu a velocidade máxima da reação, permitindo o cálculo das constantes de Michaelis-Menten para cada substrato. A fim de manter uma leitura ampla com pelo menos 2000 RFU após 30 min, os ensaios subsequentes foram padronizados com as concentrações de 100 nM 3'UTR-U₃₀, 20 μ M ATP e 80 nM de enzima. O ensaio foi utilizado para calcular as constantes de K_m do ATP e 3'UTR-U₃₀, com o intuito de comparar com os valores obtidos no estudo em que o ensaio foi baseado (Figura 20).

Figura 20 - Ensaio de cinética enzimática da RdRp a partir do ensaio RTPA. A) Curva de cinética enzimática da RdRp em diferentes concentrações de ATP, com concentrações fixas de proteína (80 nM) e 3'UTR-U₃₀ (100 nM). B) Curva de cinética enzimática da RdRp em diferentes concentrações de 3'UTR-U₃₀, com concentrações fixas de proteína (80 nM) e ATP (20 μ M).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A principal diferença observada comparando os resultados com a literatura foi entre os valores de K_m do ATP. Nos ensaios reportados para a RdRp de ZIKV por Álvarez⁸¹, o valor reportado é cerca de 21 vezes maior do que o observado para a RdRp de YFV (Tabela 3). Isso provavelmente se deve à fita molde utilizada no ensaio de atividade. Os valores de K_m de nucleotídeos para RdRp de diferentes vírus são influenciados pelas etapas de iniciação.^{47,93-94} Como mencionado anteriormente, a RdRp sintetiza o seu próprio iniciador através de um mecanismo de iniciação *de novo*. Em condições experimentais *in-vitro*, essa etapa pode ser evitada através do uso de fitas de RNA como o 3'UTR-U₃₀. Nessas condições, a iniciação *de novo* não ocorre e a reação pode ser resumida apenas nas etapas de ligação e elongação.⁵³ Os valores de K_m obtidos a partir desses ensaios tendem a ser menores quando comparados aos ensaios com a etapa de iniciação (Tabela 3). Portanto, dado que o ensaio de Álvarez⁸¹ utiliza uma fita molde poliU sem a presença de um grampo iniciador, o mecanismo de iniciação *de novo* se torna necessário, aumentando o valor de K_m do ATP.

Tabela 3 - Comparação dos valores de K_m obtido com a literatura.

K_m	NTP (μM)	RNA (nM)
YFV (ATP/3'UTR-U ₃₀)	23 $\pm$ 4	90 $\pm$ 40
ZIKV ⁸¹ (ATP/poliU)	561 $\pm$ 38	30 $\pm$ 5
HCV ⁹² (GTP <i>de novo</i>)	237 $\pm$ 40	-
HCV ⁹⁵ (GTP <i>elongação</i>)	1,8 $\pm$ 0,3	-
DENV ⁹³ (GTP <i>de novo</i>)	22 $\pm$ 3	-
DENV ⁴⁷ (GTP <i>elongação</i>)	0,37 $\pm$ 0,07	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.3 Comparação entre os ensaios de alongação

Ensaio de alongação de polimerases são tradicionalmente realizados utilizando nucleotídeos marcados. Apesar da sensibilidade desse tipo de ensaio, o alto custo e risco radioativo envolvidos dificultam a sua padronização em laboratórios acadêmicos. O ensaio de alongação FAPA, elaborado por Niyomrattanakit,⁸⁰ surgiu como uma alternativa aos ensaios comuns de polimerases envolvendo radioisótopos. Esse tipo de ensaio foi utilizado até por grandes empresas para a triagem e caracterização de compostos inibidores da RdRp de DENV3.⁹⁶ Apesar de se mostrar promissor, os ensaios FAPA utilizam uma reação acoplada para a medida indireta da atividade de alongação, o que dificulta o seu uso como um ensaio em larga escala.

Esses problemas podem ser evidenciados quando comparado com o ensaio RTPA utilizando o SGI. As curvas de atividade pelo tempo do ensaio FAPA se limitam a no máximo um ponto a cada 5 min por razões experimentais, enquanto no ensaio RTPA, o limite depende apenas da capacidade do aparelho. Um outro ponto negativo apresentado no ensaio com BBT-ATP foi a baixa fluorescência obtida, mesmo nas concentrações mais elevadas de substrato. A falta de uma leitura ampla dificulta o seu uso em ensaios de inibição, já que a diferença entre as reações com ou sem inibição variam em um curto intervalo de fluorescência, aumentando a sensibilidade a erros experimentais. Portanto, o ensaio FAPA apresenta diversas dificuldades para sua implementação na busca de ligantes contra o YFV.

Já o ensaio RTPA, permite a medida direta da atividade enzimática com uma ampla variação de fluorescência e sem a necessidade de ensaios acoplados, facilitando estudos cinéticos e a busca de inibidores para essa proteína. Por ser uma medida direta, pode-se acompanhar todo o curso temporal da reação, o que facilita a padronização e identificação de eventuais problemas. O baixo custo e a fácil implementação em triagens em larga escala, tornam os ensaios de atividade envolvendo essas sondas uma nova ferramenta para a descoberta de inibidores de polimerases virais.^{65,81,97-98} Por estes motivos, esse ensaio foi utilizado para a padronização dos protocolos de triagem de inibidores da RdRp.

4.5 Triagem da biblioteca *Pandemic Response Box*

Para avaliar o comportamento do ensaio RTPA para triagens em média escala e descobrir novos inibidores da RdRp, a biblioteca de compostos *Pandemic Response Box* (PRB) foi triada. Essa consiste em cerca de 400 compostos ativos contra bactérias, vírus ou fungos, elaborada pela organização *Medicines for Malaria Venture* (MMV) em parceria com o *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) como uma iniciativa para a busca por novos tratamentos para agentes infecciosos.⁹⁹ A biblioteca é dividida em 5 placas, nomeadas de A a E, cada uma contendo 80 compostos com características semelhantes a fármacos. A placa A consiste majoritariamente de compostos classificados como antifúngicos, a placa B e C de antibacterianos enquanto as placas D e E de antivirais. Para testar a inibição de cada composto, foi realizado um ensaio de ponto único a 20 μ M com cada uma das placas. O resultado está resumido na Figura 21.

Figura 21 - Gráfico da atividade relativa de cada composto da biblioteca PRB. Esferas vermelhas—reações controle. Esferas Cinzas – atividade relativa de cada composto testado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através da análise do gráfico, conseguimos identificar que cerca de 25 compostos atingiram uma atividade relativa menor ou igual a 20%. A média dos valores do Fator-Z obtido para todas as placas foi de $0,68 \pm 0,05$, enquadrando o ensaio como confiável (Tabela 4). O fator-Z foi semelhante a de outros trabalhos, que apresentam valores em torno de 0.6-0.8, indicando que os ensaios com sondas intercalantes podem ser utilizados como plataformas de teste em larga escala para diversas polimerases virais.^{65,92}

Tabela 4 - Valores de Fator-Z calculados para cada uma das placas da biblioteca PRB.

Placa	A	B	C	D	E
Fator-Z	0,70	0,73	0,70	0,60	0,66

Fonte: Elaborada pelo autor.

O IC_{50} foi determinado para os compostos que apresentaram uma inibição maior do que 80% nos ensaios de ponto único. A Tabela 5 mostra os valores obtidos para cada composto. Dentre os 25 inibidores identificados, 11 apresentaram uma potência menor do que 2 μM . Ensaios de triagem de inibidores possuem uma taxa de sucesso entre 0.1 a 2%, portanto, o número elevado de compostos com alta potência sugere possíveis interferências no ensaio.⁸³

Ao analisar as curvas dose-resposta dos compostos com alta inibição, notou-se que boa parte deles apresentaram uma inibição maior do que 100% nas concentrações mais elevadas, indicando uma possível interação com a fluorescência do ensaio (Figura 22). Assim, tornou-se necessário avaliar e validar os resultados obtidos para eliminar falsos-positivos.

Figura 22 - Exemplo de curvas dose resposta de compostos que apresentaram mais de 100% de inibição nas concentrações mais elevadas de ligante.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Validação dos compostos

Falsos-positivos são problemas comuns e intrínsecos de ensaios que utilizam a fluorescência para medir a atividade enzimática. Diversos fatores podem contribuir para uma falsa inibição, como por exemplo: agregação proteica promovida pelo ligante, modificações covalentes com o alvo ou interferência no ensaio.¹⁰⁰ Dois tipos de interferências podem ser consideradas nos ensaios com SGI, a primeira delas envolve a intercalação da sonda. Compostos que intercalam com o DNA ou RNA agem como competidores do SGI. A competição interfere na intercalação da sonda diminuindo a sua fluorescência em uma maneira dependente da dose.¹⁰¹⁻¹⁰³ Assim, as curvas dose-resposta dos compostos intercalantes apresentam um perfil de inibição sem inibirem de fato a proteína.

O segundo tipo de interferência é na emissão do SGI. Bibliotecas de compostos tendem a ter uma interferência maior na região azul-verde do espectro de luz visível.¹⁰⁴ As sondas intercalantes mais utilizadas atuam exatamente nessa região, aumentando o número de compostos que interferem em suas emissões.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Portanto, os ensaios com sondas intercalantes como o SGI apresentam problemas intrínsecos que aumentam os números de falsos-positivos quando comparados a outros ensaios de fluorescência, o que torna ainda mais necessária a realização de contra ensaios para a validação dos compostos encontrados.

4.6.1 Ensaio de interferência

Uma das maneiras de avaliar a interferência de compostos com o SGI é através da sua diferença de intensidade na presença de RNA ou DNA. Amostras contendo SGI e 3'UTR-U₃₀ apresentam maior intensidade quando comparadas a amostras contendo apenas a sonda.

Quando compostos interferem na intercalação ou emissão do SGI, a intensidade da amostra 3'UTR-U₃₀ na presença do composto é reduzida (Figura 23). Essa diferença de sinal pode ser usada para calcular um valor semelhante à porcentagem de inibição determinada em ensaios com proteína. Vamos chamar esse valor de porcentagem de interferência. Logo, compostos que apresentarem alta porcentagem de interferência podem ser considerados como 'inibidores' da fluorescência do ensaio.

Figura 23 – Esquema dos sinais obtidos para amostras de 3'UTR-U₃₀ na presença ou não do composto. A) Relação entre sinais para uma interferência entre 0 e 100. B) Relação entre sinais obtidos para uma interferência maior do que 100.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dos 25 compostos encontrados na triagem, apenas 7 apresentaram uma interferência menor do que 30%. (Tabela 5). Os compostos com uma inibição maior do que 100% nas curvas dose-resposta, também apresentaram valores acima de 100% para a interferência. Evidenciando que as curvas obtidas não refletem uma alta inibição enzimática. Esse resultado mostra que embora o ensaio seja prático, o número de compostos que interferem de alguma maneira é alto, diminuindo a confiabilidade dos seus resultados.

Tabela 5 - Potência e porcentagem de Interferência dos compostos identificados na triagem da biblioteca PRB.

MMV ID	Placa (Posição)	IC₅₀ (μM)	Interferência (%)
MMV1581548	A (F08)	>20	58 ± 2
MMV000043	A (F10)	1,86	62 ± 1
MMV1580853	A (B11)	8,6	58 ± 9
MMV396785	A (H03)	8,1	40,2 ± 0,7
MMV1579783	A (A09)	>20	8 ± 4
MMV020752	B (A08)	1,82	91 ± 3
MMV1580851	B (C07)	0,55 ± 0,13	114 ± 1
MMV1578574	B (E11)	0,3	70 ± 3
MMV1578571	B (H05)	>20	67 ± 8
MMV1593541	B (B09)	1,0 ± 0,2	81 ± 3
MMV1579849	B (D07)	1,6 ± 0,7	50 ± 27
MMV1581557	B (H09)	>20	2,7
MMV002459	B (H06)	9,84	52,9 ± 0,1
MMV687800	B (B04)	4 ± 2	16 ± 1
MMV1580844	B (D10)	>20	8 ± 4
MMV1581545	C (F09)	0,40 ± 0,15	113 ± 6
MMV1634402	C (E05)	0,18 ± 0,03	107 ± 5
MMV1580852	C (H09)	0,77	52 ± 5
MMV1593531	C (C06)	5 ± 1	85 ± 15
MMV010036	D (G11)	>20	33 ± 4
MMV1580482	E (A06)	9,83	55 ± 5
MMV1580488	E (F08)	1,24	111,6 ± 0,6
MMV218827	E (E04)	0,2 ± 0,1	6,9 ± 0,7
MMV1782097	E (G04)	5,6 ± 0,2	60 ± 4
MMV1782211	E (E09)	4 ± 1	27 ± 3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apenas os compostos que apresentaram interferência menor do que 30% foram considerados confiáveis. A Figura 24 mostra as curvas dose-resposta daqueles que apresentaram um IC_{50} menor do que 10 μM .

Figura 24 - Curvas dose-resposta de compostos que tiveram menos de 30% de interferência nos ensaios de validação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6.2 Fluorimetria de varredura diferencial (DSF)

A maioria dos inibidores possui a característica de aumentar a estabilidade da proteína, compostos desestabilizadores podem ser indicativos de uma segunda classe de falsos-positivos.¹⁰⁷ A estabilidade da proteína foi determinada através de DSF na presença dos ligantes que apresentaram IC_{50} menor do que 10 μM .

Os tipos de ligantes podem ser divididos em duas classes: estabilizadores e desestabilizadores. Os primeiros interagem com a forma nativa da proteína aumentando sua estabilidade, enquanto os desestabilizadores interagem com formas não-nativas ou desenoveladas gerando uma desestabilização.¹⁰⁸ Os compostos MMV687800 e MMV1782211 aumentaram a estabilidade em 3.5 e 2.5 graus respectivamente e o composto MMV218827 desestabilizou a proteína 4 graus (Figura 25).

Figura 25 - Estabilidade da proteína nos compostos que apresentaram baixa interferência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Existem diferentes tipos de interferência em ensaios de inibição, dentre eles pode-se destacar a reação não específica com proteínas.¹⁰⁰ O acúmulo de triagens em larga escala durante os últimos anos evidenciaram certos inibidores conhecidos por demonstrarem atividade em diferentes alvos.¹⁰⁹ Estudos realizados com essas moléculas, indicaram a presença de diversos grupos químicos que causam inibições não específicas em proteínas, como modificações covalentes ou oxidação.¹¹⁰ Atualmente, esses grupos são conhecidos como PAIN (*Pan-assay interference compounds*) e filtros computacionais podem ser utilizados para verificar a sua presença em diferentes compostos.¹¹⁰ Apesar de existirem grupos onde essa interferência é bem documentada, como as rodaninas por exemplo,¹¹¹ outros são mais específicos e descobertos apenas após as etapas de desenvolvimento do *hit*.¹¹²

Figura 26 - Comparação entre o grupo de fenol-sulfonamidas PAIN (A) e o composto MMV218827 (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um exemplo é a classe de fenol-sulfonamidas que interage de maneira não específica com cisteínas de diferentes proteínas. Essa interação desestabiliza o enovelamento das enzimas e consequentemente gera uma inibição (Figura 26A).¹¹³ A sua atividade inespecífica foi descoberta apenas em 2015 após problemas encontrados durante a etapa de otimização de *hits* contendo esse grupo.¹¹³ Desde então, ele foi inserido na lista de PAINS para destacar os problemas dessa classe de compostos na descoberta de novos fármacos.^{109,113}

O MMV218827 faz parte desse grupo, sugerindo que sua inibição e desestabilização é provocada por reações não específicas com a proteína (Figura 26B). Logo, apesar da alta potência, ele não foi considerado promissor devido às evidências na literatura dos problemas gerados por essa classe de compostos. Esse resultado mostra a importância de verificar a estabilidade da proteína na presença de inibidores encontrados em triagens, uma vez que compostos com atividade inespecífica são indesejáveis na busca por novos fármacos e podem ser evitados através de sua caracterização em ensaios como DSF.

4.7 Clofazimina e TTP-8307 como candidatos a antivirais contra a o vírus da febre amarela

Os compostos identificados possuem novas estruturas químicas não reportadas anteriormente na descoberta de fármacos para RdRp. O MMV1782211, conhecido como TTP-8307, foi descoberto em triagens contra a replicação de enterovírus, apresentando também atividade contra HCV e diversos rinovírus.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Seu mecanismo de ação envolve a interação com proteínas de ligação a oxisterol (OSBP), responsáveis por modificações nos ambientes lipídicos de membranas, gerando compartimentos específicos para replicação de diversos vírus.¹¹⁶⁻¹¹⁸ A replicação do YFV e DENV também foram inibidas por compostos que interagem com OSBP, indicando que os flavivírus podem ser alvos dessa classe de compostos.¹¹⁹

Figura 27 - Estruturas químicas do TTP-8307 e Clofazimina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Entretanto, o TTP-8307 apresenta algumas diferenças entre os compostos da mesma classe, como a resistência a super expressão de OSBP¹¹⁶ e um sítio de ligação distinto dos demais,¹¹⁸ apontando para um mecanismo de ação que pode envolver proteínas além da OSBP.¹¹⁶ Estudos de interactoma mostraram a interação de duas OSBP com a NS5 de ZIKV e JEV, porém não se sabe a importância dessas interações para a replicação viral.¹²⁰ Portanto, estudos devem ser realizados para verificar a atividade do TTP-8307 contra o YFV em células, e assim descobrir se existe alguma relação entre a inibição de OSBP e NS5 RdRp na replicação viral, ou se a inibição da polimerase é apenas decorrente do ensaio de elongação *in-vitro*.

O composto MMV687800 conhecido como Clofazimina foi descoberto inicialmente como um tratamento para infecções de *M. tuberculosis*, porém, foi ineficaz em humanos por causa do seu acúmulo no tecido adiposo e em células do sistema retículo endotelial.¹²¹⁻¹²² Devido à essas características, ele foi sugerido como um tratamento para hanseníase, sendo usado desde então em conjunto com dapsona e rifampicina.¹²³ O mecanismo de ação exato desse composto em bactérias é incerto, no entanto as membranas externas de bactérias gram-positivas são o principal sítio de ação.^{122,124-125} A sua atividade antiviral foi descoberta recentemente com a inibição de SARS-CoV-2 e MERS-CoV em células, apresentando um mecanismo tanto na entrada como na replicação do RNA viral.¹²⁶⁻¹²⁷ A clofazimina é capaz de interagir com guaninas presente em fitas de DNA, porém essa interação não interfere na atividade de RNA polimerase de bactérias.¹²⁸⁻¹²⁹ A maior estabilidade da RdRp de YFV na presença do composto, além de uma baixa interferência com o 3'UTR-U₃₀ e SGI, também sugerem um mecanismo que independe da interação da clofazimina com o RNA, assim, estudos podem ser realizados para verificar se o composto é capaz de impedir a replicação do RNA em células.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste projeto conseguiu-se produzir a forma recombinante ativa da RdRP de YFV em sistema de leveduras. A partir dessa amostra, foram realizadas tentativas de cristalização, padronização de ensaios de atividade, caracterização bioquímica e biofísica, além da triagem e caracterização de inibidores para a RdRp de YFV. Os ensaios de cristalização levaram à formação de microcristais de proteína em algumas condições de diferentes *kits* apenas após a diminuição da concentração de sal na proteína, porém, nenhum cristal foi obtido. A atividade enzimática foi padronizada nos ensaios de elongação FAPA e RTPA, contudo, o primeiro apresentou limitações que dificultam o seu uso na descoberta de inibidores da RdRp de YFV. O ensaio de elongação RTPA por sua vez, apresentou diversas vantagens para a busca de inibidores, sendo prático e confiável para a triagem de compostos em larga escala. Apesar do bom desempenho, o ensaio mostrou uma alta interferência por compostos, indicando que devido aos problemas intrínsecos de sondas intercalantes, ensaios de validação são necessários para excluir falsos-positivos. O ensaio de interferência a partir do 3'UTR-U₃₀ permitiu verificar de maneira fácil a interferência de compostos no ensaio RTPA, podendo ele ser utilizado no futuro para a validação de inibidores. A triagem da biblioteca PRB resultou em 3 compostos com baixa interferência e potências na ordem de 0.2 a 4 μ M. No entanto, o composto mais potente desestabilizou a proteína em ensaios de DSF e foi desconsiderado como um inibidor promissor por pertencer a um grupo de moléculas que causam inibição não específica em proteínas. A Clofazimina ($IC_{50} = 4 \mu$ M) e TTP-8307 ($IC_{50} = 4 \mu$ M) aumentaram a estabilidade da proteína e possuem estruturas químicas inéditas para inibidores de RdRp.

Os resultados obtidos contribuem para o desenvolvimento de fármacos para a febre amarela e antivirais que usam a RdRp como alvo. Os compostos encontrados podem ser avaliados para inibição em células ou estudados mais profunda por estudos de mutação ou complexos enzima-ligante.

Os ensaios de atividade e validação dos compostos permitem novos projetos para a triagem de outras bibliotecas contra a RdRp de YFV, expandindo não só o estudo na descoberta de novos fármacos para a febre amarela, mas também a busca por inibidores específicos de diferentes RdRp virais.

REFERÊNCIAS

- 1 BLOM, F. Yellow fever. an epidemiological and historical study of its place of origin. **American Anthropologist**, v. 34, n. 3, p. 537–538, 1932.
- 2 FRANCO, O. **A história da febre amarela no País**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1969.
- 3 SILVA, L. J. Vírus, mosquitos e modernidade: a febre amarela no Brasil entre ciência e política. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n.10, p. 2518-2519, 2007.
- 4 FOSTER, K. R.; JENKINS, M. F.; TOOGOOD, A. C. The Philadelphia yellow fever epidemic of 1793. **Scientific American**, v. 279, n. 2, p. 88–93, 1998.
- 5 GOTSCHLICH, E. C. Bullets and bacilli the Spanish-American war and military medicine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 1, p 1-3, 2005.
- 6 STERN, A. M. The public health service in the Panama Canal: a forgotten chapter of U.S. public health. **Public Health Reports**, v. 120, n. 6, p. 675–679, 2005.
- 7 FINLAY, C. The mosquito hypothetically considered as an agent in the transmission of yellow fever poison. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 9, n. 6, p. 589–604, 1937.
- 8 REED, W. *et al.* The Etiology of Yellow Fever-a preliminary note. **Public Health Papers and Reports**, v. 26, n. 1, p. 37–53, 1900.
- 9 COSTA, Z. G. A. *et al.* Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 11–26, 2011.
- 10 TASCO, A. H. O surto de febre amarela no Rio de Janeiro (1928-1929) (pontos controversos). SEMINÁRIO NACIONAL DE HISTÓRIA DA CIÊNCIA E DA TECNOLOGIA, 13., 2012, São Paulo. **Anais** [...]. São Paulo: SBHC, 2012.
- 11 MAGALHÃES, R. C. S. **International cooperation in health in the interwar period: the Rockefeller Foundation's worldwide anti-yellow fever campaign and its implementation in Brazil (1918-1939)**. 2012. Disponível em: <https://www.issueab.org/resources/27869/27869.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2021.
- 12 OLDSTONE, M. B. A. History of virology. **Encyclopedia of Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 608-612, 2014.
- 13 BRYAN, C. S. Discovery of the yellow fever virus. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 52–54, 1997.
- 14 SOPER, F. L. The elimination of urban yellow fever in the Americas through the eradication of *Aedes aegypti*. **American Journal of Public Health and the Nation's Health**, v. 53, n. 1, p. 7–16, 1963.
- 15 STRODE, G. K. *et al.* **Yellow Fever**. Nova Iorque: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1951.

16 BARRETT, A. D. T.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annual Review of Entomology**, v. 52, n. 1, p. 209–229, 2007.

17 CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Características epidemiológicas da febre amarela no Brasil, 2000-2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 1, p. 10–11, 2016.

18 VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p. 275-293, 2003.

19 GARSKE, T. *et al.* Yellow fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. **PLoS Medicine**, v. 11, n. 5, p. e1001638, 2014.

20 GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. HHS public access. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 237–260, 2010.

21 THEILER, M.; SMITH, H. H. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 6, p. 787–800, 1937.

22 MONATH, T. P.; GERSHMAN, M.; STAPLES, J. E.; BARRETT, A. D. T. Yellow fever vaccines. *In*: PLOTKIN S. A.; ORENSTEIN, W. A.; OFFIT, P. A. (ed.). **Vaccines**. 6th ed. Amsterdã: Elsevier, 2012. p. 870–896..

23 STAPLES, J. E. *et al.* Review of data and knowledge gaps regarding yellow fever vaccine-induced immunity and duration of protection. **Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2020.

24 JUAN-GINER, A. *et al.* Immunogenicity and safety of fractional doses of yellow fever vaccines: a randomized, double-blind, non-inferiority trial. **medRxiv**, v. 397, n. 10269, p. 1-12, 2020.

25 MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, n. 1, p. 160–173, 2015.

26 LINDSEY, N. P. *et al.* Adverse event reports following yellow fever vaccination, 2007-13. **Journal of Travel Medicine**, v. 23, n. 5, p. 1–6, 2016.

27 RIBEIRO, A. F. *et al.* A public health risk assessment for yellow fever vaccination: a model exemplified by an outbreak in the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 230-234, 2015.

28 MONATH, T. P. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 4, p. 427–448, 2012.

29 CHEN, L. H.; HAMER, D. H. Vaccination challenges in confronting the resurgent threat from yellow fever. **JAMA - journal of the american medical association**, v. 318, n. 17, p. 1651–1652, 2017.

30 MONATH, T. P. Treatment of yellow fever. **Antiviral Research**, v. 78, n. 1, p. 116–124, 2008.

- 31 JULANDER, J. G. Experimental therapies for yellow fever. **Antiviral Research**, v. 97, n. 2, p. 169–179, 2013.
- 32 PILGER, D. R. B. *et al.* Drug repurposing for yellow fever using high content screening. **bioRxiv**, v. 1, n. 1, p. 1-23, 2017.
- 33 JULANDER, J. G. *et al.* Comparison of the inhibitory effects of interferon alfacon-1 and ribavirin on yellow fever virus infection in a hamster model. **Antiviral Research**, v. 73, n. 2, p. 140–146, 2007.
- 34 DE FREITAS, C. S. *et al.* Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–22, 2019.
- 35 JULANDER, J. G. *et al.* BCX4430, a novel nucleoside analog, effectively treats yellow fever in a hamster model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6607–6614, 2014.
- 36 JULANDER, J. G. *et al.* Activity of T-1106 in a hamster model of yellow fever virus infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1962–1966, 2007.
- 37 MENDES, É. A. *et al.* Sofosbuvir inhibits yellow fever virus in vitro and in patients with acute liver failure. **Annals of Hepatology**, v. 18, n. 6, p. 816–824, 2019.
- 38 CÂMARA, F. P.; CARVALHO, L. M.; BACELLAR GOMES, A. L. Demographic profile of sylvatic yellow fever in Brazil from 1973 to 2008. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 5, p. 324–327, 2013.
- 39 SILVA, N. I. O. *et al.* Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2020.
- 40 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da febre amarela no Monitoramento 2019/2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. 46, p. 1–19, 2020.
- 41 AHMED, Q. A.; MEMISH, Z. A. Yellow fever from Angola and Congo: a storm gathers. **Tropical Doctor**, v. 47, n. 2, p. 92–96, 2017.
- 42 LING, Y. *et al.* Yellow fever in a worker returning to China from Angola, march 2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1317–1318, 2016.
- 43 WHO. **A global strategy to eliminate yellow fever epidemics (EYE) 2017-2026**. Geneva: World Health Organization, 2018.
- 44 GODOY, A. S. *et al.* Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent. **Nature Communications**, v. 8, n.1, p. 1–6, 2017.
- 45 KLEMA, V. J.; PADMANABHAN, R.; CHOI, K. H. Flaviviral replication complex: coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4640–4656, 2015.
- 46 LIM, S. P.; NOBLE, C. G.; SHI, P. Y. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. **Antiviral Research**, v. 119, n. 4, p. 57–67, 2015.

- 47 NOMAGUCHI, M. *et al.* De novo synthesis of negative-strand RNA by Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase In vitro: nucleotide, primer, and template parameters. **Journal of Virology**, v. 77, n. 16, p. 8831-8842, 2003.
- 48 WU, J. *et al.* A structural overview of RNA-dependent RNA polymerases from the Flaviviridae family. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12943–12957, 2015.
- 49 AZZI, A.; LIN, S.-X. Structure function analysis of west nile virus RNA dependent RNA polymerase: molecular model and implications for drug design. **Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 455–459, 2007.
- 50 SELISKO, B. *et al.* Structural and functional basis of the fidelity of nucleotide selection by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases. **Viruses**, v. 10, n. 59, p.1-24, 2018.
- 51 APPLEBY, T. C. *et al.* Structural basis for RNA replication by the hepatitis C virus polymerase. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 771–775, 2015.
- 52 SELISKO, B. *et al.* Molecular basis for nucleotide conservation at the ends of the Dengue Virus Genome. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. 1-13, 2012.
- 53 ACKERMANN, M.; PADMANABHAN, R. De novo synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39926–39937, 2001.
- 54 NG, K. K. S.; ARNOLD, J. J.; CAMERON, C. E. Structure-function relationships among RNA-dependent RNA polymerases. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 320, n. 1, p. 137–156, 2008.
- 55 PICARAZZI, F. *et al.* Targeting the RdRp of emerging RNA viruses: the structure-based drug design challenge. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 1-25, 2020.
- 56 STELTZ, T. A. A mechanism for all polymerases. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 231–232, 1998.
- 57 DUBANKOVA, A.; BOURA, E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses. **Antiviral Research**, v. 169, n. 6, p. 1-8, 2019.
- 58 DELARUE, M. *et al.* An attempt to unify the structure of polymerases. **Protein Engineering**, v. 3, n. 6, p. 461–467, 1990.
- 59 MALET, H. *et al.* The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. **Antiviral Research**, v. 80, n. 1, p. 23–35, 2008.
- 60 SACRAMENTO, C. Q. *et al.* The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n.1, p. 1-12, 2017.
- 61 XU, H. T. *et al.* Evaluation of Sofosbuvir (β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

- 62 DRAGONI, F. *et al.* Evaluation of sofosbuvir activity and resistance profile against West Nile virus in vitro. **Antiviral Research**, v. 175, n.1, p. 1-7, 2020.
- 63 KONKOLOVA, E. *et al.* Remdesivir triphosphate can efficiently inhibit the RNA-dependent RNA polymerase from various flaviviruses. **Antiviral Research**, v. 182, n. 7, p. 10–13, 2020.
- 64 NOBLE, C. G. *et al.* A conserved pocket in the dengue virus polymerase identified through fragment-based screening. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 16, p. 8541–8548, 2016.
- 65 SHIMIZU, H. *et al.* Discovery of a small molecule inhibitor targeting dengue virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 11, p. 1–21, 2019.
- 66 ARORA, R. *et al.* Two RNA tunnel inhibitors bind in highly conserved sites in Dengue virus NS5 polymerase: structural and functional studies. **Journal of Virology**, v. 94, n. 24, p. 1-48, 2020.
- 67 MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. emerging pandemic diseases: how we got to COVID-19. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1077–1092, 2020.
- 68 GUO, D. Old Weapon for new enemy: drug repurposing for treatment of newly emerging viral diseases. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 3, p. 253–255, 2020.
- 69 CHITALIA, V. C.; MUNAWAR, A. H. A painful lesson from the COVID-19 pandemic: the need for broad-spectrum, host-directed antivirals. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2020.
- 70 PARDI, N.; WEISSMAN, D. Development of vaccines and antivirals for combating viral pandemics. **Nature Biomedical Engineering**, v. 4, n. 12, p. 1128–1133, 2020.
- 71 ADALJA, A.; INGLESBY, T. Broad-spectrum antiviral agents: a crucial pandemic tool. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 7, p. 467–470, 2019.
- 72 WANG, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Cell Research**, v. 30, n. 3, p. 269–271, 2020.
- 73 BONALDO, M. C. *et al.* Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 447–451, 2017.
- 74 LUNDBLAD, V. Yeast cloning vectors and genes. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 1993.
- 75 GNÜGGE, R.; RUDOLF, F. *Saccharomyces cerevisiae* Shuttle vectors. **Yeast**, v. 34, n. 5, p. 205–221, 2017.
- 76 THOMAS, S.; MAYNARD, N. D.; GILL, J. DNA library construction using Gibson Assembly®. **Nature Methods**, v. 12, n. 11, p. 1–2, 2015.
- 77 BRICKER, D. K. *et al.* A Mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, drosophila, and humans. **Science**, v. 337, n. 6090, p. 96–100, 2012.

78 GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 35–37, 2007.

79 WILKINS, M. R. *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods Molecular Biology**, v. 112, n.1, p. 531–552, 1999.

80 NIYOMRATTANAKIT, P. *et al.* A fluorescence-based alkaline phosphatase-coupled polymerase assay for identification of inhibitors of dengue virus RNA-Dependent RNA polymerase. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 16, n. 2, p. 201–210, 2011.

81 SÁEZ-ÁLVAREZ, Y. *et al.* Development of a fluorescence-based method for the rapid determination of Zika virus polymerase activity and the screening of antiviral drugs. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

82 COPELAND, R. A. **Enzymes**: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. Estados Unidos: John Wiley & Sons, 2004.

83 MACARRON, R. *et al.* Impact of high-throughput screening. **Nature**, v. 10, n. 3, p. 188–195, 2011.

84 ZHANG, J. H.; CHUNG, T. D. Y.; OLDENBURG, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67–73, 1999.

85 HALL, T. A. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n.1, p. 95–98, 1999.

86 CAMACHO, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 421, p. 1-9, 2009.

87 ANTONIOU, G.; PAPAKYRIACOU, I.; PAPANEOPHYTOU, C. Optimization of soluble expression and purification of recombinant human rhinovirus type-14 3C protease using statistically designed experiments: isolation and characterization of the enzyme. **Molecular Biotechnology**, v. 59, n. 10, p. 407–424, 2017.

88 LUFT, J. R.; NEWMAN, J.; SNELL, E. H. Crystallization screening: the influence of history on current practice. **Acta Crystallographica Section F: structural biology communications**, v. 70, n. 7, p. 835–853, 2014.

89 MESTAS, S. P.; SHOLDERS, A. J.; PEERSEN, O. B. A fluorescence polarization-based screening assay for nucleic acid polymerase elongation activity. **Analytical Biochemistry**, v. 365, n. 2, p. 194–200, 2007.

90 TANG, G.-Q.; ANAND, V. S.; PATEL, S. S. Fluorescence-based assay to measure the real-time kinetics of nucleotide incorporation during transcription elongation. **Journal of Molecular Biology**, v. 405, n. 3, p. 666–678, 2011.

91 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, n.1, p. 1667–1676, 2018.

- 92 ELTAHLA, A. A. *et al.* A fluorescence-based high-throughput screen to identify small compound inhibitors of the genotype 3a hepatitis c virus RNA polymerase. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 18, n. 9, p. 1027–1034, 2013.
- 93 SELISKO, B. *et al.* Comparative mechanistic studies of de novo RNA synthesis by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases. **Virology**, v. 351, n. 1, p. 145–158, 2006.
- 94 CHINNASWAMY, S.; CAI, H.; KAO, C. An update on small molecule inhibitors of the HCV NS5B polymerase: effects on RNA synthesis in vitro and in cultured cells, and potential resistance in viral quasispecies. **Virus Adaptation and Treatment**, v. 2, n. 1, p. 73–89, 2010.
- 95 LUO, G. *et al.* De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 2, p. 851–863, 2000.
- 96 SMITH, T. M. *et al.* Identifying initiation and elongation inhibitors of dengue virus RNA polymerase in a high-throughput lead-finding campaign. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 153–163, 2015.
- 97 TARANTINO, D. *et al.* Targeting flavivirus RNA dependent RNA polymerase through a pyridobenzothiazole inhibitor. **Antiviral Research**, v. 134, n. 1, p. 226–235, 2016.
- 98 KOCABAS, F.; TURAN, R. D.; ASLAN, G. S. Fluorometric RdRp assay with self-priming RNA. **Virus Genes**, v. 50, n. 3, p. 498–504, 2015.
- 99 ABOUT the Pandemic Response Box. California, 2016. Disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/pandemic-response-box/about-pandemic-response-box>. Acesso em: 17 jan. 2021.
- 100 SINK, R. *et al.* False positives in the early stages of drug discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 34, p. 4231–4255, 2010.
- 101 KOBAYASHI, M.; SZOSTEK, A.; KONOPA, J. Limitation of usage of PicoGreen dye in quantitative assays of double-stranded DNA in the presence of intercalating compounds. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 4, p. 883–886, 2007.
- 102 PETERSON, E. J. R. *et al.* Inhibitors of Streptococcus pneumoniae surface endonuclease EndA discovered by high-throughput screening using a PicoGreen fluorescence assay. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 18, n. 3, p. 247–257, 2013.
- 103 BHATIA, R. *et al.* Assessment of SYBR green I dye-based fluorescence assay for screening antimalarial activity of cationic peptides and DNA intercalating agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2886–2889, 2015.
- 104 SIMEONOV, A.; DAVIS, M. I. Interference with fluorescence and Absorbance. **Assay Guidance Manual**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2016.
- 105 DRAGAN, A. I. *et al.* Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding. **Biophysical Journal**, v. 99, n. 9, p. 3010–3019, 2010.

- 106 DRAGAN, A. I. *et al.* SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. **Journal of Fluorescence**, v. 22, n. 4, p. 1189–1199, 2012.
- 107 WALDRON, T. T.; MURPHY, K. P. Stabilization of proteins by ligand binding: application to drug screening and determination of unfolding energetics. **Biochemistry**, v. 42, n. 17, p. 5058–5064, 2003.
- 108 CIMPERMAN, P. *et al.* A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 7, p. 3222–3231, 2008.
- 109 BAELL, J.; WALTERS, M. A. Chemistry: chemical con artists foil drug discovery. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 481–483, 2014.
- 110 BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2719–2740, 2010.
- 111 TOMAŠIĆ, T.; PETERLIN MAŠIČ, L. Rhodanine as a scaffold in drug discovery: a critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 7, p. 549–560, 2012.
- 112 BAELL, J. B. Observations on screening-based research and some concerning trends in the literature. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 10, p. 1529–1546, 2010.
- 113 DAHLIN, J. L. *et al.* PAINS in the assay: chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2091–2113, 2015.
- 114 DE PALMA, A. M. *et al.* Mutations in the nonstructural protein 3A confer resistance to the novel enterovirus replication inhibitor TTP-8307. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1850–1857, 2009.
- 115 THIBAUT, H. J. *et al.* Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections. **Antiviral Research**, v. 90, n. 3, p. 213–217, 2011.
- 116 ALBULESCU, L. *et al.* Uncovering oxysterol-binding protein (OSBP) as a target of the anti-enteroviral compound TTP-8307. **Antiviral Research**, v. 140, n. 1, p. 37–44, 2017.
- 117 WANG, H. *et al.* Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. **Gastroenterology**, v. 146, n. 5, p. 1373–1385, 2014.
- 118 ROBERTS, B. L. *et al.* Differing activities of oxysterol-binding protein (OSBP) targeting anti-viral compounds. **Antiviral Research**, v. 170, n. 6, p. 1–8, 2019.
- 119 MEUTIAWATI, F. *et al.* Posaconazole inhibits dengue virus replication by targeting oxysterol-binding protein. **Antiviral Research**, v. 157, n. 2, p. 68–79, 2018.
- 120 KOVANICH, D. *et al.* Analysis of the Zika and Japanese Encephalitis Virus NS5 interactomes. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 8, p. 3203–3218, 2019.

- 121 BARRY, V. C. *et al.* A new series of phenazines (rimino-compounds) with high antituberculosis activity. **Nature**, v. 179, n. 4568, p. 1013–1015, 1957.
- 122 CHOLO, M. C. *et al.* Clofazimine: current status and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 290–298, 2012.
- 123 BROWNE, S. G.; HOGERZEIL, L. M. “B 663” in the treatment of leprosy. preliminary report of a pilot trial. **Leprosy Review**, v. 33, n. 1, p. 6–10, 1962.
- 124 VAN RENSBURG, C. E. *et al.* Antimicrobial activities of clofazimine and B669 are mediated by lysophospholipids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2729–2735, 1992.
- 125 ARBISER, J. L.; MOSCHELLA, S. L. Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 2, p. 241–247, 1995.
- 126 RIVA, L. *et al.* Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. **Nature**, v. 586, n. 7827, p. 113–119, 2020.
- 127 YUAN, S. *et al.* Clofazimine is a broad-spectrum coronavirus inhibitor that antagonizes SARS-CoV-2 replication in primary human cell culture and hamsters. **Research Square**, v.1, n.1, p. 1–26, 2020.
- 128 MORRISON, N. E.; MARLEY, G. M. The mode of action of clofazimine DNA binding studies. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 44, n. 1–2, p. 133–134, 1976.
- 129 OLIVA, B. *et al.* Anti-staphylococcal activity and mode of action of clofazimine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 435–440, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Artigos completos publicados em periódicos

1 NOSKE, G. D.; **GAWRILJUK, V. O.**; FERNANDES, R. F.; FURTADO, N. D.; BONALDO, M. C.; OLIVA, G.; GODOY, A. S. Structural characterization and polymorphism analysis of the NS2B-NS3 protease from the 2017 Brazilian circulating strain of Yellow Fever virus. **Biochimica et Biophysica Acta** - general subjects, v. 1864, n. 4, p. 129521, 2020.