

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARJORIE CAROLINE LIBERATO CAVALCANTI FREIRE

Busca por candidatos a fármacos contra viroses epidêmicas e pandêmicas, tendo como alvo a RNA-polimerase dependente de RNA (nsP4) do Alfavírus Chikungunya e a *papain-like* protease (PL-pro) do Betacoronavírus SARS-CoV-2

São Carlos
2022

MARJORIE CAROLINE LIBERATO CAVALCANTI FREIRE

Busca por candidatos a fármacos contra viroses epidêmicas e pandêmicas, tendo como alvo a RNA-polimerase dependente de RNA (nsP4) do Alfavírus Chikungunya e a *papain-like protease* (PL-pro) do Betacoronavírus SARS-CoV-2

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2022

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

Freire, Marjorie Caroline Liberato Cavalcanti

Busca por candidatos a fármacos contra viroses epidêmicas e pandêmicas, tendo como alvo a RNA-polimerase dependente de RNA (nsP4) do Alfavirus Chikungunya e a papain-like protease (PL-pro) do Betacoronavirus SARS-CoV-2 / Marjorie Caroline Liberato Cavalcanti Freire; orientador Glaucius Oliva - versão corrigida -- São Carlos, 2022.

130 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Chikungunya. 2. nsp4. 3. Caracterização biofísica. 4. Antivirais. 5. PLpro. I. Oliva, Glaucius, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que sofreram
ou que perderam familiares e pessoas queridas para
a COVID-19. Que Deus possa confortar os seus corações
e que a ciência esteja sempre caminhando em direção a
busca de soluções para esses desafios.

Que o conhecimento seja sempre uma fonte de luz.

AGRADECIMENTOS

Ao final desta etapa tão importante, expresso aqui os meus mais sinceros agradecimentos. Primeiramente à Deus, por ter sido sempre a minha fonte de força, paciência, discernimento e luz. A minha família: meu pai Kaleb, minha mãe Luciana, meus avós Pedro e Rosali, minhas tias Paula, Kalyna e Katienne, minha prima Luzia e meu namorado Fernando, por sempre acreditarem em mim, entenderem minha ausência física durante esses anos e principalmente por serem os meus maiores incentivadores. Agradeço também a minha cachorrinha Lua, por alegrar e tornar os meus dias mais leves.

Agradeço ao Prof. Dr. Glaucius Oliva por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e por ter fornecido toda a orientação e suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Seus ensinamentos foram de grande importância para a minha formação profissional e também pessoal. Aqui, expresso também a minha admiração por ser este incrível pesquisador, professor, pessoa e por tudo o que representa para a Ciência Brasileira.

Aos colegas de trabalho do laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos: Caroline, Nathalya, Gabriela, Danielle, Ketlyn, Renata, Andre, Rafaela, Victor, Guilherme, expresso aqui os meus agradecimentos pelo convívio, colaborações, troca de conhecimento, cafézinhos e momentos de descontração. Cada um, com seu jeito e suas particularidades, serão sempre lembrados.

Aos os amigos da vida: Ohanna, Marcela, Isabelle, Beatriz, Brunna, Klarissa, Tâmisa, Morganna, Ana Clara, Luiza, Gabriela, Matheus e Felipe, que apesar de alguns estarem longe fisicamente, se fizeram bastante presentes esses anos, sendo apoio, ombro amigo, pontos de equilíbrio e também tornando os meus dias mais leves. Sei que para alguns não foi fácil ouvir horas e horas sobre experimentos e proteínas, mas vocês foram fundamentais neste processo e deixo aqui o meu super obrigada!

Agradeço ao Dr. Luis Guilherme Mansor Basso (Militar), por sua importância no andamento deste trabalho, transmitindo o seu conhecimento técnico, auxiliando na discussão dos dados e por me motivar a sempre aprender mais. Adicionalmente, agradeço ao Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos pela estrutura disponibilizada para a realização dos experimentos de Biofísica.

Ao Prof. Fabio Almeida, que me recebeu tão bem em seu laboratório no Centro Nacional de Ressonância Nuclear – CNRMN/UFRJ durante o meu último ano de doutorado, agradeço por toda atenção e troca de conhecimento. Além de um excelente pesquisador, sua humanidade, motivação e dedicação servem como exemplo a ser seguido. Agradeço também

aos alunos Ariana, Peter, Beatriz, Lucas, Guilherme, Gabriela, Aléxia, Aline e Karen, por terem me acolhido tão bem no laboratório e por toda a ajuda, trabalho em equipe e convivência neste último ano.

Agradeço ao Instituto de Física de São Carlos e a todos os professores os quais tive a oportunidade de ter contato ou cursar disciplinas e que com certeza contribuíram para a minha formação. Agradeço também aos técnicos, funcionários e seguranças que fazem parte do Instituto e que exercem um papel fundamental em deixar o ambiente organizado e seguro para a realização das nossas pesquisas.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da minha bolsa de doutorado e ao Centro Nacional de Biodiversidade de Fármacos (CEPID, Fapesp) pelos recursos e estrutura para realização do meu projeto.

A todos vocês, o meu MUITO OBRIGADA!



*“A flor que desabrocha nas adversidades
é a mais rara e bela de todas”*

Mulan, filme Walt Disney – 1998

RESUMO

FREIRE, M.C.L.C. **Busca por candidatos a fármacos contra viroses epidêmicas e pandêmicas, tendo como alvo a RNA-polimerase dependente de RNA (nsP4) do alfavírus Chikungunya e a papain-like protease (PL-Pro) do betacoronavírus SARS-CoV-2.** 2022. 130 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

O desenvolvimento de estratégias para o controle de doenças causadas por vírus apresentou um notório crescimento nas últimas décadas, no entanto, o desenvolvimento de tratamentos específicos ainda continua sendo desafiador e necessário para muitas dessas infecções. Neste contexto, o conhecimento detalhado das etapas de replicação viral e os componentes envolvidos neste processo contribuem significativamente para o desenvolvimento de novos antivirais. Dentre as doenças virais que ainda permanecem sem tratamentos específicos, a Febre Chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV) e transmitida pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*. O vírus CHIKV é um vírus de RNA de fita simples de sentido positivo, pertencente ao gênero *Alphavirus*, cujo material genético codifica duas poliproteínas que após clivadas, dão origem a cinco proteínas estruturais e quatro não estruturais. Dentre as proteínas não estruturais, a nsP4 (nsP4-CHIKV) é a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e tem função crucial no processo de replicação do RNA viral, sendo assim considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais. Neste projeto, a nsP4-CHIKV foi expressa, purificada e caracterizada através de um conjunto de métodos biofísicos, gerando informações estruturais e dinâmicas. Na busca por novas moléculas com potencial antiviral para este alvo, uma série de compostos foi avaliada e dentre eles, um composto denominado LabMol-309 foi identificado e sua interação com a proteína foi avaliada através de métodos biofísicos e computacionais. A atividade antiviral do composto LabMol-309 foi confirmada através de ensaios celulares utilizando sistemas replicon e vírus repórter. Adicionalmente, diante da pandemia causada pelo novo coronavírus, o SARS-CoV-2, e dentro do esforço emergencial de pesquisa conduzido pelo CIBFar/CEPID/IFSC/USP, estudos também foram desenvolvidos juntamente com grupos colaboradores, para buscar soluções para esse grave problema global de saúde pública. Dentre as proteínas do SARS-CoV-2, a protease PLpro (*papain-like protease*) é responsável pelo processamento da poliproteína viral, atuando na replicação e, dessa forma, considerada um alvo importante para a busca de fármacos. Neste projeto, a PLpro foi expressa, purificada e foram realizados ensaios de inibição da atividade enzimática para triagens de séries de compostos e peptídeos inibidores. Dentre as séries avaliadas, os peptídeos derivados da região C-terminal da Bothropstoxina-I apresentaram-se promissores e foram avaliados em ensaios celulares com o vírus, confirmando o potencial inibitório. Esse projeto está vinculado ao CIBFar/CEPID da FAPESP e tem também como objetivo estabelecer uma base no grupo, que já possui experiência com outras arboviroses, para estudos do CHIKV e do SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Chikungunya. nsP4. Caracterização biofísica. Antivirais. PLpro.

ABSTRACT

FREIRE, M.C.L.C. **Search for drug candidates against epidemic and pandemic viruses, targeting the RNA-dependent RNA polymerase (nsP4) of the Chikungunya virus and the papain-like protease (PL-Pro) of the SARS-CoV-2 virus.** 2022. 130p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The development of control strategies for viral diseases has shown notable growth in recent decades. However, the development of specific treatments remains challenging and necessary for many infections. In this context, the detailed knowledge of the viral replication steps and the components involved in this process contributes significantly to the development of new antivirals. Among the viral diseases that remain without specific treatments, Chikungunya Fever is caused by the Chikungunya virus (CHIKV) and transmitted by the bite of female mosquitoes of the *Aedes* genus. CHIKV is a positive-sense single-stranded RNA virus belonging to the Alphavirus genus. Its genome encodes two polyproteins, which, after cleaved, give rise to five structural and four non-structural proteins. Among the non-structural proteins, nsP4 (nsP4-CHIKV) is the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). It has a crucial role in the viral RNA replication process, thus being considered a promising target for developing new antiviral drugs. In this project, nsP4-CHIKV was expressed, purified and characterized using biophysical methods, generating structural and dynamics information. A series of compounds were evaluated in the search for new molecules with antiviral potential for this target. A compound named LabMol-309 was identified, and biophysical and computational methods evaluated its interaction with the protein. The inhibitory activity of the compound LabMol-309 was confirmed by cellular assays using a replicon system and reporter virus. In addition, given the pandemic caused by the new coronavirus SARS-CoV-2, and within the emergency research effort conducted by CIBFar/CEPID, studies were also carried out together with collaborating groups that came together to seek solutions to this serious global problem of public health. Among SARS-CoV-2 proteins, the protease PLpro (papain-like protease) is responsible for processing the viral polyprotein, acting on replication and is considered a key target for searching for drugs. In this project, PLpro was expressed, purified, and enzymatic activity assays were performed to screen a series of compounds and peptides. Among the evaluated series, the peptides derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I were promising and were assessed in cell assays with the virus, confirming its inhibitory potential. This project is part of the CIBFar/CEPID/FAPESP and aims to establish a base in the group, which already has experience with other arboviruses, for CHIKV and SARS-CoV-2 studies.

Keywords: Chikungunya. nsP4. Biophysical characterization. Antivirals. PL-pro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática do genoma do CHIKV. Em azul claro está quadro de leitura aberta 1 (ORF, do inglês *open reading frame*) que codifica para as quatro proteínas não estruturais. Em cinza, a ORF 2, que codifica para as cinco proteínas estruturais. 29
- Figura 2** - Esquema resumido da replicação do vírus Chikungunya, evidenciando o processamento das poliproteínas e atuação das proteínas virais. 31
- Figura 3** - **A)** Sequência de aminoácidos da proteína nsP4-CHIKV. Em vermelho, região da sequência aonde está localizado o domínio RdRp. Os resíduos de ácido aspártico catalíticos (Asp371 e Asp466) estão destacados em verde e a sequência GDD está marcada com um retângulo roxo. **B)** Gel de acrilamida 12,5% das frações eluídas durante a gel filtração: M, marcador de peso molecular; Elu1, eluição da proteína na primeira etapa de afinidade; Ptev, fração após a clivagem com a TEV protease; Elu2, eluição da proteína na segunda etapa de afinidade; P1, fração correspondente ao primeiro pico da gel filtração; P2, fração correspondente ao segundo pico da gel filtração, onde está presente a nsP4 CHIKV purificada (54,54 kDa). **C)** Cromatograma obtido na etapa de purificação de gel filtração 48
- Figura 4** - Análise de SEC-MALS para a nsP4-CHIKV em solução. A proximidade da massa molecular estimada de (60 ± 1) kDa com a massa molecular teórica da proteína sugere a predominância do estado monomérico. 52
- Figura 5** - Perfil de estrutura secundária da nsP4 de CHIKV obtida por CD. 53
- Figura 6** - Estabilidade térmica da nsP4 CHIKV obtida por CD. A elipticidade em 222 nm em função da temperatura foi transformada para a fração de proteína desenovelada. **A)** Taxa de aquecimento de 0,5 °C/min. **B)** Taxa de aquecimento de 1,0 °C/min. As linhas sólidas representam o ajuste aos dados de CD utilizando um modelo de equilíbrio de dois estados. 56
- Figura 7**- Perfil de desnaturação química da nsP4 CHIKV. As alterações na elipticidade foram monitoradas em 222nm, a temperatura constante e avaliadas em função da concentração de uréia. 57
- Figura 8** - **A)** Dados de DSC da desnaturação térmica irreversível da nsP4 CHIKV (concentração de 12 µM) e a linha de base correspondente do tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 5% glycerol), obtidos usando uma taxa de aquecimento de 10 °C/h. **B)** Capacidade térmica excedente da nsP4-CHIKV nas quatro taxas de aquecimento, como indicado, obtidas após a normalização pela concentração da proteína e subtração da linha de base do tampão. 60
- Figura 9** - Gráfico de Arrhenius mostrando a dependência da temperatura de desenovelamento (T_m) da nsP4 CHIKV com a taxa de aquecimento. A inclinação da reta corresponde a energia de ativação para o processo de desnaturação irreversível da nsP4 CHIKV. 62
- Figura 10** - Estrutura química do composto LabMol-309, identificado nos experimentos de DSF. 63

- Figura 11** – **A)** Ensaio de checagem de ligação com o composto LabMol-309 na concentração única de 200 μM , indicando a supressão da fluorescência inicial quando comparada a amostra controle (apenas com DMSO). **B)** Curva de afinidade de ligação do LabMol-309 a nsP4-CHIKV. 65
Constante de dissociação estimada $k_D \pm \Delta k_D = 6 \pm 1 \mu\text{M}$.
- Figura 12** - Assinalamento do composto LabMol-309. **(A)** e **(B)** representam os espectros de RMN do LabMol-309 e as suas respectivas posições de ressonância dos prótons. Os espectros ^1H - ^{13}C -HSQS, COSY e TOCSY foram obtidos a 298 K, utilizando o compostos nas concentrações de 0,25 mM (linha vermelha) e 1 mM (linha azul) em D_2O . **C)** Estrutura do LabMol-309 e os respectivos posicionamentos dos prótons. 66
- Figura 13** - Análise de CSP baseada na sobreposição dos espectros do composto LabMol-309 obtidos na presença (linha vermelha) e ausência (linha azul) da proteína nsP4-CHIKV. A direita, as diferenças nos deslocamentos químicos foram medidas (em Hz) para cada próton da estrutura do LabMol-309. 67
- Figura 14** - Modelo tridimensional da nsP4-CHIKV obtido pelo AlphaFold2. **A)** Modelo colorido de acordo com o pLDDT, onde as escalas de cores estão representadas na parte superior direita. **B)** Modelo da nsP4-CHIKV colorido de acordo com o assinalamento de domínios. As hélices da região N-terminal, dedos, domínio catalítico e polegar estão coloridos em roxo, azul, verde e vermelho, respectivamente. Na inserção, é apresentada uma visão detalhada do resíduos de ácido aspártico catalíticos. **C)** Projeção do potencial eletrostático na superfície da nsP4-CHIKV, calculado através do método APBS. As regiões positivas estão representadas em azul e as regiões negativas em vermelho. **D)** Análise do modelo da nsP4-CHIKV utilizando o ConSurf, na qual os aminoácidos são coloridos de acordo com o grau de conservação das regiões. Na barra de cores, o sentido em direção a cor verde indica maior variabilidade e o sentido em direção a cor roxa indica maior conservação. 69
- Figura 15** - Modelo de interação entre a nsP4-CHIKVA e o LabMol-309, obtido através dos cálculos de docking. **A)** Representação em 3D das interações entre os resíduos da nsP4-CHIKV e o LabMol-309. As ligações de hidrogênio estão representadas pelas linhas pontilhadas na cor cinza e as interações cátion- π pela linha pontilhada verde. Os átomos de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio estão mostrados em vermelho, azul e branco, respectivamente. Os átomos de carbono do LabMol-308 estão representados em rosa e os dos resíduos proteína estão em cinza. Os resíduos catalíticos da região GDD então destacados em negrito. **B)** 71
Diagrama de interação 2D do LabMol-309 com a nsP4-CHIKV. As ligações de hidrogênio estão representadas pelas linhas pontilhadas na cor cinza e as interações cátion- π pela linha pontilhada verde. Os resíduos catalíticos da região GDD estão destacados em azul.

- Figura 16** - Avaliação da estabilidade estrutural através de simulações de dinâmica molecular do modelo do complexo nsP4-CHIKV-LabMol-309. **A)** Análise de RMSD para os átomos da cadeia principal da proteína (linha preta) e os átomos (não hidrogênios) do composto (linha cinza). **B)** Número de contatos entre os átomos da nsP4-CHIKV e do LabMol-309 a distâncias inferiores a 0,6 nm. **C)** Número de ligações de hidrogênio formadas entre a proteína e o composto. 72
- Figura 17** - Efeito do composto LabMol-309 no sistema replicon de CHIKV. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e realizados em duplicatas **A)** Curva de EC₅₀ gerada a partir da incubação das células com o composto em diluição seriada de 20 µM a 0,03 µM, durante 48h. A atividade *Gluc* foi medida utilizando o sobrenadante celular. **B)** Curva de CC₅₀ gerada a partir da incubação das células com o composto em diluição seriada de 100 µM a 0,3 µM, durante 48h. A viabilidade celular foi medida utilizando o sobrenadante celular. 76
- Figura 18** - Efeito do composto LabMol-309 na viabilidade de células BHK-21 e na replicação do CHIKV-*nanoluc*. As células BHK-21 foram tratadas com o LabMol-309, numa faixa de concentração de 0,78 a 100 µM, na presença ou ausência do CHIKV-*nanoluc* durante 16h. A replicação viral foi quantificada através da medição da atividade da Nanoluciferase (indicado por ●) e a viabilidade celular foi medida utilizando o ensaio de MTT (indicado por ■). Resultados representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As barras de erros representam os desvios padrão. Figuras e análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 8. 77
- Figura 19** - Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2. Em azul claro estão os quadros de leitura aberta (ORF1a e ORF1b) que codificam para as 16 proteínas não estruturais. Em cinza, a ORF que codifica para as quatro proteínas estruturais e em verde os genes que codificam para as proteínas acessórias. Fonte: Elaborado pela autora. 85
- Figura 20** - Estrutura tridimensional da PLpro de SARS-CoV-2, resolvida experimentalmente através de Difração de Raios-X (PDB ID: 7CMD (186). A representação foi colorida por perfil de estrutura secundária, onde as folhas estão representadas em amarelo, as hélices em roxo e azul, e as estruturas de voltas em ciano. 88
- Figura 21** - **A)** Sequência de aminoácidos da proteína PLpro de SARS-CoV-2. Em vermelho, região da sequência aonde está localizado o domínio peptidase. Em verde e destacado de amarelo, as CYS112 e HIS 273, que formam o sítio catalítico. **B)** Gel de acrilamida 12,5% das frações eluídas durante a gel filtração: M, marcador de peso molecular; F.S., fração solúvel do lisado pós centrifugação; Ft, fração que não se ligou na coluna, também chamada de “*flow through*”; Elu, eluição da proteína na primeira etapa de afinidade; GF, fração correspondente ao pico da gel filtração, onde está presente a PLpro de SARS-CoV-2 purificada (35,90 kDa). **C)** Cromatograma obtido na etapa de purificação de gel filtração. 95
- Figura 22** - Curvas de concentração-resposta para a série de Inibidores de Proteases e os seus valores de IC₅₀. 98

- Figura 23** - Curvas de concentração-resposta para a série de compostos MMV Pandemic Response Box e os valores de IC_{50} . 100
- Figura 24** - Curvas de concentração-resposta para a série de Peptídeos sintéticos (série 1) e os valores de IC_{50} . 103
- Figura 25** - Curvas de concentração-resposta para a série de Peptídeos sintéticos (série 2) e os valores de IC_{50} . 107

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Condições tamponantes e de aditivos utilizadas no ensaio de DSF. O ΔT_m é a diferença entre o T_m da nsP4 CHIKV inicial (em tampão de gel filtração) e a nova T_m apresentada na condição avaliada. 49
- Tabela 2** - Métodos utilizados na desconvolução do espectro de CD da nsP4 CHIKV utilizando diferentes bases de dados espectrais de proteínas. O conteúdo de estrutura secundária para cada par método-base é apresentado na forma de fração de hélices (H), folhas (F), voltas (T, do inglês *turns*), estruturas irregulares ou desordenadas (U, do inglês *unordered*) e NRMSD. 54
- Tabela 3** - Parâmetros termodinâmicos de desenovelamento da nsP4 CHIKV obtidos por CD. A temperatura de *melting* (T_m) e a variação de entalpia aparente (ΔH_{app}) para 2,0 μ M de proteína em duas taxas de aquecimento foram determinadas através do ajuste dos dados de CD a um modelo de equilíbrio de dois estados. 56 A variação de entropia aparente (ΔS_{app}) foi calculada como $\Delta S_{app} = \Delta H_{app} / T_m$, considerando $\Delta G = 0$ para cada T_m .
- Tabela 4** - Parâmetros termodinâmicos associados a desnaturação térmica da nsP4 CHIKV por DSC. T. A. corresponde a taxa de aquecimento. A temperatura de desenovelamento ou de *melting*, T_m , representa a temperatura onde a curva de excesso de capacidade térmica atinge o valor máximo. A variação de entalpia calorimétrica, ΔH_{cal} , foi calculada como a área sob a curva de DSC. 61 O $\Delta T_{1/2}$ corresponde a largura da metade da altura do pico de transição. A variação de entalpia da transição de desenovelamento a uma dada T_m , ΔS , foi calculada como $\Delta S = \Delta H_{cal} / T_m$. A variação da entalpia de van't Hoff, ΔH_{vH} , foi calculada como sendo $4RT_m^2 C_{p,max} / \Delta H_{cal}$. Incertezas: T_m ($\pm 0,2$ °C), ΔH_{cal} ($\pm 1-3$ kcal/mol), $\Delta T_{1/2}$ ($\pm 0,2$ °C). As análises dos termogramas foram realizadas utilizando o *software* MicroCal Origin.
- Tabela 5** - Deslocamentos químicos medidos para cada os prótons assinalados na estrutura do composto LabMol-309. Os deslocamentos em Hz foram medidos através das distâncias entre os picos na sobreposição dos espectros. 67
- Tabela 6** - Percentuais de ocupação das ligações de hidrogênio formadas entre a nsP4-CHIKV e o LabMol-309, através de simulações de dinâmica molecular de 100 ns. Em negrito, os percentuais significativos de ocupação das ligações de hidrogênio (superiores a 5%). 73
- Tabela 7** - Efeito do composto LabMol-309 na viabilidade de células BHK-21 (CC50) e na replicação do CHIKV (EC50) durante 16h de tratamento. 77
- Tabela 8** - Séries de moléculas utilizadas nos ensaios de ponto-único para triagem de moléculas inibidoras. Estão apresentados os números de compostos/peptídeos de cada série e o número de compostos/peptídeos que apresentaram inibição da atividade enzimática superior a 70%. 96
- Tabela 9** - Descrição da série de Inibidores de Proteases que apresentaram inibição

superior a 70%, com os seus respectivos códigos de identificação, nomes e pesos moleculares (em kDa) e valores de IC₅₀ (com o desvio padrão e em micromolar). 97

Tabela 10 - Descrição da série de compostos do MMV Pandemic Response Box que apresentaram inibição superior a 70%, com os seus respectivos códigos de identificação, nomes, classes farmacológicas e valores de IC₅₀ (em micromolar). 100

Tabela 11 - Descrição dos componentes da série de Peptídeos Hecates que apresentaram inibição superior a 70%, com os seus respectivos nomes, grupamentos conjugados a cadeia principal do Hecate, pesos moleculares (em Dálton) e valores de IC₅₀ (em micromolar). 103

Tabela 12 - Descrição dos componentes da série de Peptídeos derivados da Bothropstoxina-I que apresentaram inibição superior a 70%, com os seus respectivos nomes, sequência de aminoácidos, pesos moleculares (em Dálton) e valores de IC₅₀ (em micromolar). Nas sequências, os destaques em vermelho representam as alterações que foi realizada em cada peptídeo. O peptídeo Hy-a1 foi utilizado como controle para investigar interações inespecíficas. 106

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 CAPÍTULO I: PROTEÍNA NSP4 – RNA-POLIMERASE DEPENDENTE DE RNA DO VIRUS CHIKUNGUNYA (NSP4-CHIKV)	25
2.1 O vírus CHIKV: isolamento, epidemiologia e cenário atual	25
2.2 Febre Chikungunya: aspectos gerais, diagnóstico, tratamento e profilaxia	27
2.3 Genoma, Proteínas e Replicação do CHIKV.....	29
2.4 Proteína nsP4 RNA-Polimerase dependente de RNA do CHIKV como alvo para a busca de inibidores	32
3 OBJETIVOS	35
4 METODOLOGIA	37
4.1 Clonagem e expressão em larga escala da nsP4-CHIKV.....	37
4.2 Purificação da nsP4-CHIKV	37
4.5.2 <i>Dicroísmo Circular (CD)</i>	40
4.5.3 <i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	41
4.6 Ensaio de interação com compostos	41
4.6.1 <i>Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF)</i>	41
4.6.2 <i>Termoforese em Microescala (MST)</i>	41
4.6.3 <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	42
4.7 Modelo tridimensional da nsP4-CHIKV e análises estruturais	42
4.8 <i>Docking</i> molecular da nsP4-CHIKV com o LabMol-309 e simulações de dinâmica molecular (DM)	43
4.9 Ensaio celular	44
4.9.1 <i>Células e Vírus</i>	44
4.9.2 <i>Ensaio utilizando sistema Replicon de CHIKV</i>	44
4.9.3 <i>Ensaio de infecção utilizando CHIKV-nanoluc</i>	45
4.9.4 <i>Ensaio de viabilidade celular em células BHK-21</i>	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Obtenção da nsp4-chikv purificada.....	47
5.2 Avaliação de estabilidade	48
5.3 Ensaio de cristalização	51
5.4 Caracterização biofísica	51
5.4.1 <i>Cromatografia líquida de exclusão de tamanho acoplada a espalhamento de luz multiangular (SEC-MALS)</i>	51
5.4.2 <i>Dicroísmo Circular (CD)</i>	52
5.4.3 <i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	59
5.5 Ensaio de interação com compostos	62
5.5.1 <i>Triagem de compostos por DSF</i>	62
5.5.2 <i>Avaliação da interação por MST</i>	64
5.5.3 <i>Avaliação dos deslocamentos químicos por RMN</i>	65
5.6 Modelo tridimensional da nsP4-CHIKV e análise estrutural	68
5.7 <i>Docking</i> molecular e dinâmica molecular do complexo nsP4-CHIKV-LabMol-309	70
5.8 Ensaio celular	74

6 CONCLUSÕES	79
7 CAPÍTULO II: PROTEÍNA PLPRO – PAPAINE LIKE PROTEASE DO SARS-COV-2	81
7.1 O vírus SARS-CoV-2: isolamento, epidemiologia e cenário atual	81
7.2 COVID-19: aspectos gerais, diagnóstico, tratamento e profilaxia	83
7.3 Genoma, proteínas e replicação do vírus SARS-CoV-2	85
7.4 Proteína PLpro do SARS-CoV-2 como alvo para a busca de inibidores	87
8 OBJETIVOS	89
9 METODOLOGIA	91
9.1 Clonagem e expressão em larga escala da PLpro de SARS-CoV-2	91
9.2 Purificação da PLpro de SARS-CoV-2	91
9.3 Ensaios de inibição da atividade enzimática	92
9.4 Triagem de compostos através do ensaio de inibição enzimática de ponto único	92
9.5 Ensaios de concentração-resposta (IC ₅₀)	93
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
10.1 Obtenção da PLpro de SARS-CoV-2 purificada	95
10.2 Triagem de compostos através do ensaio de inibição enzimática de ponto único	96
10.3 Ensaios de concentração-resposta (IC ₅₀)	97
10.3.1 <i>Série de Inibidores de Proteases</i>	97
10.3.2 <i>MMV Pandemic Response Box</i>	99
10.3.3 <i>Peptídeos Hecates</i>	102
10.3.4 <i>Peptídeos derivados da Bothropstoxina-I</i>	105
10.4 Continuidade dos estudos com a série de peptídeos derivados da Bothropstoxina-I	108
11 CONCLUSÕES	111
12 ARTIGOS PUBLICADOS	113
REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

As infecções virais estão entre as principais causas de doenças em humanos, podendo levar a quadros de saúde debilitantes e a ocorrência de óbitos. Neste cenário, novos vírus podem ser transmitidos a humanos a partir de outras espécies, podendo facilmente se estabelecer e persistir na população. Além disso, podem ocorrer mutações no material genético dos vírus já existentes, levando ao surgimento de variantes que rapidamente se adaptam a novas situações ambientais, dispersando-se e ocasionando grandes surtos. (1)

É notório que nas últimas décadas, crescentes avanços em pesquisas possibilitaram uma maior compreensão dos vírus em geral, no que se refere a sua estrutura, biologia, mecanismos de infecção viral, fisiopatologia e resposta do hospedeiro a essas infecções. (1) Além disso, o desenvolvimento das vacinas, representou um grande marco no âmbito da saúde pública e possibilitou a profilaxia eficaz dessas doenças virais, reduzindo o número de infecções e óbitos. (2)

Apesar deste notório avanço, uma série de doenças virais ainda permanecem sem vacinas, o que torna importante e necessário o desenvolvimento de novos tratamentos eficazes e específicos. (2-3) Dentre elas, pode-se mencionar a “Febre Chikungunya”, que é uma arbovirose causada pelo vírus artritogênico Chikungunya (CHIKV) e transmitida através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*. (4) Além da inexistência de vacinas licenciadas disponíveis, o outro desafio do manejo da Febre Chikungunya é em relação ao seu tratamento, pois até o momento, ainda não foram aprovados antivirais específicos para essa arbovirose. Dessa forma, essa realidade configura um grave problema de saúde pública, pois os constantes surtos geram uma sobrecarga no sistema de saúde e a evolução crônica desta doença impacta expressivamente no exercício das atividades de trabalho e qualidade de vida dos pacientes. (5)

Adicionalmente, um outro fato que impulsiona a busca por fármacos antivirais é a emergência de novos vírus, em especial os vírus causadores de doenças respiratórias, que rapidamente se espalham causando danos em uma escala global. A partir de dezembro de 2019, a população mundial vivenciou o surgimento do novo Coronavírus SARS-CoV-2, que foi identificado pela primeira vez na província de Wuhan, na China. (6) Desde então, sua dispersão ocorreu rapidamente, impactando a economia e os sistemas de saúde de todo o mundo e isso fez com que a Organização Mundial de Saúde declarasse a doença como uma situação de pandemia. (7) Diante das graves consequências geradas por esse vírus, um rápido desenvolvimento de candidatos vacinais ocorreu de forma nunca vivenciada pela comunidade

científica. (8) No entanto, apesar das vacinas já estarem sendo disponibilizadas, a cobertura de toda a população mundial ainda representa um grande desafio e o tempo para isso ocorrer permanece indeterminado. Sendo assim, mesmo no contexto da existência das vacinas, faz-se necessária a busca por alternativas terapêuticas, como os antivirais, uma vez que a cobertura e eficácia vacinal sugerem que casos de COVID-19 ainda continuarão a acontecer e novas variantes podem continuar surgindo. (9-10)

Neste cenário, quando se pensa no desenvolvimento de novos fármacos para essas doenças, a busca por moléculas com atividade antiviral depende da compreensão das reações e interações que ocorrem a nível molecular, durante o processo de infecção. Assim, cada etapa que ocorre no ciclo viral representa um potencial sítio de intervenção, no qual as diferentes proteínas virais surgem como alvos promissores para estes fins. (3)

Para isso, devem ser consideradas as duas principais estratégias racionais utilizadas: o planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo ou SBDD (do inglês, *Structure-Based Drug Design*) e o planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante ou LBDD (do inglês, *Ligand-Based Drug Design*). A primeira, baseia-se na utilização de informações estruturais do alvo desejado para o desenvolvimento de um inibidor específico. O alvo, comumente é uma proteína viral ou alguma proteína ou receptor da célula hospedeira. Sendo assim, a disponibilidade da sua estrutura tridimensional é o pré-requisito quando se pensa na utilização desta abordagem. (11) Para isso, os métodos experimentais mais utilizados na resolução de estruturas de proteínas são a Cristalografia de Raios-X, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e, mais recentemente, a Criomicroscopia eletrônica (Cryo-EM, do inglês *Cryoelectron microscopy*). (11)

Por outro lado, na ausência de informações estruturais do alvo, a estratégia de LBDD é utilizada para a busca de compostos inibidores e também para a otimização de compostos líderes. (11) No LBDD, o conhecimento acerca das moléculas de um conjunto de ligantes e o modo de interação destes com o alvo são estudados para criar modelos matemáticos das propriedades físico-químicas do ligante que se correlacionam com a atividade farmacológica desejada. (12) Para isso, são utilizadas tanto abordagens computacionais, como os estudos de *docking* molecular e de relação estrutura-atividade, bem como abordagens experimentais, como os métodos que se baseiam em princípios biofísicos e bioquímicos. (12)

Os métodos biofísicos são amplamente utilizados neste contexto, pois possibilitam a realização de triagens de amplas bibliotecas de ligantes. Esses métodos fornecem informações relevantes sobre a interação entre essas moléculas e o alvo de interesse, como constantes de equilíbrio e de ligação, parâmetros cinéticos e termodinâmicos e também a detecção de

mudanças conformacionais associadas a essas interações. (13) Dentre eles, método de fluorimetria diferencial de varredura (DSF, do inglês *differential scanning fluorimetry*) vem sendo uma excelente ferramenta de triagem nas fases iniciais da busca de fármacos, por ser um método rápido, acessível e de fácil implementação. (14) Os métodos calorimétricos como a calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês *isothermal titration calorimetry*) e a calorimetria diferencial de varredura (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) também merecem destaque tanto como forma de validar os resultados das triagens previamente feitas, quanto para realizar análises independentes. (15-16)

Os métodos espectroscópicos como as espectroscopias de fluorescência e de dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*), bem como a ressonância magnética nuclear (RMN) também geram informações consistentes sobre a interação entre ligantes e proteína alvo. (17) Outros métodos como a ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*), espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) e mais recentemente a técnica de termoforese em microescala (MST, do inglês *MicroScale thermophoresis*) também integram as técnicas biofísicas que geram grandes contribuições para os estudos nesta área. (18–20) Neste trabalho, os métodos biofísicos que foram utilizados serão discutidos em detalhes nas suas respectivas seções.

Além da estratégia de LBDD, os métodos computacionais também podem ser importantes ferramentas na busca de fármacos quando a estrutura do alvo não foi resolvida experimentalmente. Essa abordagem é denominada modelagem por homologia ou similaridade, e possibilita a predição estrutural baseando-se em outras estruturas de proteínas similares que já foram resolvidas. (11,21) Além disso, com os recentes avanços expressivos nessa área, já é possível prever o modelo tridimensional a partir da sequência de aminoácidos, sem a necessidade de estruturas molde. (22)

Um exemplo que é considerado uma das mais recentes e impactantes revoluções na área de biologia estrutural, é o programa de predição de estruturas de proteínas AlphaFold2, que é baseado em aprendizagem de máquina profunda (do inglês, *deep learning*). (23) Este programa foi anunciado no final de 2020 pela companhia de inteligência artificial DeepMind e apresentou um excelente desempenho no evento bienal *Critical Assessment of Protein Structure Prediction* (CASP), com a predição de modelos com qualidade que se aproximavam da determinação experimental. Devido ao seu impacto científico, o AlphaFold2 foi considerado pela Revista Science como o “*Breakthrough of The Year 2021.*” (22) Em 2021, o código do AlphaFold2 tornou-se disponível publicamente e também foram desenvolvidos outros programas como o RoseTTAFold, que vem possibilitando a predição de estruturas de

proteínas e também de complexos proteicos. (22) Assim, a integração entre esses métodos computacionais e os métodos experimentais possibilitará inúmeras contribuições no âmbito da identificação e desenvolvimento de novos fármacos. (24)

Sendo assim, diante da relevância da busca por novos fármacos, em especial para as doenças virais, o presente trabalho tem como foco as doenças infecciosas Febre Chikungunya e COVID-19 e apresenta-se dividido em dois capítulos. O primeiro, traz uma introdução específica, metodologia e resultados dos estudos desenvolvidos com a enzima polimerase nsP4 do vírus Chikungunya (nsP4-CHIKV), o que inclui a sua obtenção, caracterização biofísica e a busca de ligantes para este alvo. O segundo capítulo irá apresentar-se nos mesmos moldes e refere-se aos estudos realizados com a enzima protease PLpro do vírus SARS-CoV-2, incluindo a sua obtenção e a utilização de ensaios enzimáticos para triagem de compostos e peptídeos ligantes para esse alvo. Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho fornecem informações que irão contribuir para o maior entendimento destas proteínas alvo e para os avanços na busca e desenvolvimento de novos antivirais para essas doenças.

2 **CAPÍTULO I: PROTEÍNA nsP4 – RNA-POLIMERASE DEPENDENTE DE RNA DO VIRUS CHIKUNGUNYA (nsP4-CHIKV)**

2.1 O vírus CHIKV: isolamento, epidemiologia e cenário atual

O vírus CHIKV foi isolado e identificado pela primeira vez no ano de 1952 na Tanzânia (África), durante um surto epidêmico de uma doença semelhante a Dengue, na qual os pacientes infectados apresentavam severas dores articulares e musculares, febre alta e erupções cutâneas. (25) O nome “Chikungunya” é de origem africana, da linguagem Kimakonde (tribo Makonde), que significa “aquele que se dobra” ou “corpo contorcido”, que descrevia a postura curvada comumente observada nos pacientes, devido ao comprometimento músculo-articular causado pela infecção. (26)

A partir desta identificação, nos anos seguintes foram reportados outros surtos que se restringiam as regiões da África e região Sudeste da Ásia, em países como África do Sul, República Democrática do Congo, Uganda, Indonésia, Tailândia e Índia. (27) Devido a essa distribuição geográfica, estudos filogenéticos sugerem que o CHIKV teve origem na África e em seguida dispersou-se para a Ásia, sendo então classificado filogeneticamente em três linhagens: Oeste Africana (WA, do inglês *West African*), Leste/Central/Sul Africana (ECSA, do inglês *East/Central/South African*) e a linhagem Asiática (AL, do inglês *Asian lineage*). (28)

A dispersão do CHIKV tornou-se mais acentuada a partir de 2004, com um grande surto na costa do Quênia, que rapidamente espalhou-se para as Ilhas do Oceano Índico, Índia e sudeste Asiático, totalizando aproximadamente 6 milhões de casos. (29) A partir desses casos e análises filogenéticas, foi incluída a quarta linhagem, denominada de Oceano Índico (IOL, do inglês *Indian Ocean Lineage*). Entre o ano de 2004 e 2006, mais casos aconteceram nas regiões de Comores, Índia, Sri Lanka, Ilhas Maldivas, Cingapura, Malásia e Indonésia. (26)

O cenário tornou-se ainda mais preocupante após 2007, quando o CHIKV foi identificado na Itália (29) e em 2010 quando foram notificados casos nos Estados Unidos e França. Neste mesmo ano, também ocorreram grandes surtos na Índia, Indonésia, Mianmar, Tailândia, Ilhas Maldivas, Ilhas Reunião e Taiwan. (29) No ano de 2013, o CHIKV chegou ao sub-continente latinoamericano, inicialmente dispersando-se na região do Caribe e alcançando o Brasil no ano seguinte. Ao final de 2014, aproximadamente 1,5 milhões de casos foram reportados e confirmados em 50 diferentes regiões das Américas. (30)

A chegada do CHIKV ao Brasil no ano de 2014 ocorreu com a confirmação dos primeiros casos na região Norte em Oiapoque (Amapá) e na região Nordeste em Feira de Santana (Bahia). Em apenas um mês após essa identificação, mais de 600 casos já haviam sido confirmados. (30) Entre 2014 e 2017, ocorreram mais de 300 mil casos, contando com mais de 200 óbitos. (26) Nos anos seguintes, ocorreu uma diminuição expressiva do número de casos confirmados e de óbitos, no entanto os casos continuaram a acontecer no país. Um aumento na incidência foi notificado em 2020, com predominância nas regiões Nordeste e Sudeste, tendo sido registrados 82.419 casos e 31 óbitos confirmados.

Em 2021, foram reportados mais de 96 mil casos e 14 óbitos, o que reflete um aumento de aproximadamente 30% quando comparado ao ano anterior. A região Nordeste liderou o percentual de casos, onde pode-se destacar um surto em Pernambuco com aumento de 148%. (31) No cenário mundial para este mesmo ano, mais de 220 mil casos foram reportados, localizados na Bolívia, México, Colômbia, Peru e Paraguai, sendo ainda o Brasil o líder no número de casos nas Américas. Na região da Ásia também foram reportados casos na Índia, Cambodja, Malásia e Tailândia, e na região Africana os casos ocorreram na República Democrática do Congo (<https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>).

Atualmente, até abril de 2022 já foram notificados mais de 47 mil casos, o que corresponde a um aumento de 40% em relação ao mesmo período do ano anterior. Em relação a distribuição, as regiões Nordeste e Sudeste lideraram com as maiores incidências de casos. O Brasil segue sendo notoriamente o país com o maior número de casos de infecção por CHIKV. (32) Casos também foram notificados na Bolívia, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Paraguai, Peru e Venezuela. No continente Asiático, foram notificados aumentos de casos na Índia, Malásia e Tailândia. Também foram notificados casos no continente Africano, em especial na Etiópia e Kênia (<https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>).

Desde o seu primeiro isolamento até o momento atual, as infecções por CHIKV foram reportadas em diferentes países em todos os continentes, exceto na Antártica. (29) A prevalência de surtos na região da América do Sul pode ser explicada por fatores climáticos e de habitat que favorecem a manutenção do vetor em circulação. (28) Além disso, a co-circulação do CHIKV com outros arbovírus, como Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Febre Amarela (YFV) e Mayaro (MAYV), torna necessária uma rigorosa vigilância epidemiológica, estratégias de diagnóstico diferencial para uma correta confirmação dos casos e a estruturação de medidas de controle e combate ao vetor. (29)

2.2 Febre Chikungunya: aspectos gerais, diagnóstico, tratamento e profilaxia

A Febre Chikungunya, causada pelo CHIKV, é transmitida principalmente de forma vetorial, através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, no qual as espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* são atualmente as mais relevantes na transmissão urbana. Outras vias como a transmissão através de transfusões de sangue e através da saliva também já foram reportadas. (33-34) A transmissão vertical materno-fetal também já foi relatada e durante a epidemia de 2016 no Brasil, foi observado um caso de encefalite neonatal, evidenciando a possibilidade de infecção congênita. (35-36) Posteriormente, outras manifestações clínicas foram reportadas em neonatos provenientes de parturientes em estado de viremia, como casos de meningoencefalite, lesões císticas cerebrais, miocardite, convulsões e insuficiência respiratória aguda. (37-38) Embora a transmissão congênita tenha sido confirmada, a transmissão através do leite materno não foi evidenciada até o momento. (39) Em relação a uma possível transmissão sexual, o material genético do CHIKV foi detectado em amostras de sêmen de pacientes ainda 30 dias após o desaparecimento dos sintomas, entretanto mais estudos são necessários para a confirmação dessa via de transmissão. (29,39)

O período de incubação do CHIKV pode variar de um a doze dias e os indivíduos infectados apresentam período de viremia de até dez dias, no qual em média 80% dos casos ocorrem de forma sintomática. (4,29) Em relação aos sintomas, a Febre Chikungunya apresenta duas fases, a primeira consistindo em uma fase aguda e que pode evoluir para a segunda fase, representada pela cronificação da doença. A fase aguda é caracterizada por febre alta, poliartralgia, mialgia, dores de cabeça, edemas na face e extremidades, dor periorbital e erupções cutâneas (*rashes*). (26,40) A poliartralgia bilateral é o sintoma mais característico, afetando principalmente articulações periféricas (tornozelos, punhos e falanges) e algumas articulações grandes (joelhos e cotovelos). (29) Outros sintomas menos comuns como diarreia, vômitos, náuseas e dores abdominais podem ocorrer também na fase aguda. (29)

Após essa primeira fase, aproximadamente 40% dos pacientes evoluem para a segunda fase, que é a fase crônica. Esta é caracterizada pela permanência da poliartralgia e/ou poliartrose e dores musculares, podendo persistir por meses e até anos, o que causa severas limitações de mobilidade e impacta diretamente na qualidade de vida do paciente. (5,40-42) A persistência desses sintomas já foi relatada para infecções por outros Alfavírus como o Vírus da Floresta de Semliki (SFV) e o Vírus Sindbis (SINV), sendo associada à persistência dos antígenos virais e ativação constante da resposta imune da região das articulações. (43)

Em relação aos antígenos virais presentes, ainda não há um consenso estabelecido na literatura se realmente há replicação viral ou se eles são apenas o resultado de uma depuração atrasada de antígenos virais não replicativos. (44) Adicionalmente, outro fator que contribui para o processo inflamatório crônico é a presença de infiltrados celulares de macrófagos, monócitos e linfócitos e mediadores próinflamatórios como IL-6, IL-8 e MCP-1 no fluido sinovial. (43)

No que se refere ao diagnóstico da infecção causada pelo CHIKV, é realizado através da observação clínica e exames laboratoriais. No entanto, é notória a dificuldade no diagnóstico clínico principalmente em áreas onde co-circulam outros arbovírus como DENV e ZIKV, devido à similaridade de sintomas entre as infecções na fase aguda. Assim, o diagnóstico laboratorial diferencial é necessário para a confirmação dos casos de acordo com a respectiva etiologia viral. (29)

Métodos laboratoriais específicos para a identificação do CHIKV baseiam-se na detecção de RNA viral, isolamento do vírus e testes sorológicos. (45) Tanto a detecção de RNA viral quanto o isolamento viral devem ser feitos utilizando amostras de sangue coletadas de pacientes infectados durante o período de viremia, idealmente até 7 dias após o surgimento dos sintomas. A detecção do RNA viral é o principal método de detecção do vírus e é feito através da amplificação e identificação do material genético viral presente nas amostras utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR, do inglês *Reverse transcription - polymerase chain reaction*). Já no diagnóstico através de isolamento viral, o material coletado é preparado e inoculado em culturas de células, na quais são observados os efeitos citotóxicos e os resultados confirmados por métodos de fluorescência. (45) Entretanto, devido a complexidade e custo elevado do isolamento viral, esse método não é comumente empregado em rotinas de diagnóstico, limitando-se a institutos de pesquisa e centros de referência. (29)

Já o diagnóstico sorológico, pode ser realizado nas fases posteriores da doença, sendo geralmente indicado a partir do sétimo dia após o aparecimento dos sintomas clínicos. O principal método utilizado é o ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) e baseia-se na busca de anticorpos específicos para o CHIKV em amostras de soro dos pacientes. (45) Através deste método, é possível detectar anticorpos dos tipos IgM e IgG, possibilitando a distinção entre as fases aguda e crônica (ou convalescente), respectivamente. (29) Os anticorpos IgM podem ser detectados a partir do quarto dia de infecção e até três meses após a doença, enquanto os anticorpos IgG podem ser detectados por meses e até anos. (46) De forma geral, os métodos de diagnóstico descritos acima apresentam

alta especificidade e alta acurácia, sendo importantes aliados na investigação clínica e também nas notificações dos casos para os sistemas de vigilância epidemiológica.

Apesar dos constantes surtos que ocorrem de Febre Chikungunya e os impactos que representam no âmbito da Saúde Pública, ainda não existem medicamentos antivirais específicos para a realização de tratamentos eficazes, principalmente no caso de pacientes com permanência da fase crônica. (29) Dessa forma, a infecção é tratada sintomaticamente utilizando analgésicos e antipiréticos na fase aguda, enquanto que na fase crônica são utilizados principalmente anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e corticoides. (26)

Além da ausência de tratamentos específicos, até o momento ainda não existem vacinas licenciadas disponíveis para a profilaxia desta doença. Neste contexto, as estratégias de controle eficiente dos mosquitos vetores representa uma medida crucial para a prevenção da infecção por CHIKV. (47) Portanto, uma ação integrada dos sistemas de vigilância epidemiológica juntamente com a gestão ambiental, com foco em ações educativas para eliminar potenciais criadouros de mosquitos, bem como o uso de inseticidas, são essenciais para controlar e reduzir a incidência e surtos de Febre Chikungunya. (29)

2.3 Genoma, Proteínas e Replicação do CHIKV

O CHIKV é um vírus esférico envelopado, com RNA fita simples de polaridade positiva, pertencente a família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*. O seu genoma tem aproximadamente 12 kb e codifica para duas poliproteínas distintas: estrutural e não estrutural (48) (**Figura 1**). A poliproteína estrutural é clivada dando origem a cinco proteínas estruturais, denominadas E1, E2, E3, C e 6k (49,50) e a poliproteína não estrutural origina quatro proteínas (nsP1-nsP4).

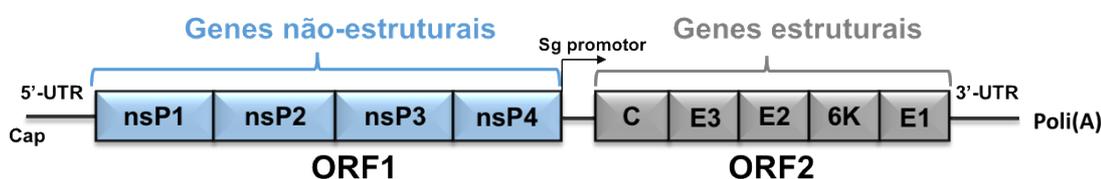


Figura 1 - Representação esquemática do genoma do CHIKV. Em azul claro está o quadro de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*) que codifica para as quatro proteínas não estruturais. Em cinza, a ORF 2, que codifica para as cinco proteínas estruturais.

Fonte: Elaborada pela autora.

As glicoproteínas de envelope E1 e E2 associam-se em heterodímeros e estão organizadas na forma de “*spikes*” triméricos recobrando a superfície viral. Essas proteínas

atuam diretamente no processo de infecção, sendo a E2 responsável pela interação e ancoramento ao receptor celular e a E1 pela fusão com a membrana da célula hospedeira. (28) Devido essa a função da E2, ela é considerada a proteína mais imunogênica do CHIKV e principal alvo para anticorpos neutralizantes. (51) A proteína de capsídeo (C) é responsável por englobar o material genético viral, formando o nucleocapsídeo e também possui um domínio carboxílico com atividade auto-catalítica de protease. (43) A proteína E3 apresenta funções semelhantes a chaperona, auxiliando no enovelamento correto das outras proteínas de envelope e também se mantém associada a E2 até o momento da clivagem pela furina celular, tornando os spikes ativos. Adicionalmente, acredita-se que a E3 também atua escondendo o *loop* de fusão da E1 durante o egresso celular. (28) Por fim, a 6k é uma proteína acessória que atua no processamento do envelope, auxilia na montagem do vírus e possui função de canal iônico, aumentando a liberação das partículas virais. (43) De forma geral, por serem proteínas de superfície, as proteínas estruturais (em especial as de envelope) são alvos da resposta imune humoral e dessa forma tornam-se interessantes para serem exploradas em estratégias de desenvolvimento de vacinas contra CHIKV e terapias baseadas em anticorpos. (52)

Já a poliproteína não estrutural, é clivada e origina as proteínas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, que juntas fazem parte do complexo de replicação do genoma viral e também possuem algumas funções no processo de infecção, como a interação com fatores do hospedeiro. (48,53-54) Dentre elas, a nsP1 possui as funções enzimáticas de metiltransferase e guanililtransferase, realizando o capeamento do RNA viral. Além disso, também realiza o ancoramento do complexo de replicação na membrana celular. (43) Já a nsP2 é uma proteína multifuncional, na qual sua região N terminal possui as atividades NTPase e helicase, e a sua região C-terminal tem a atividade de cisteína protease, responsável pelo processamento da poliproteína não estrutural. (43) A nsP3 é uma proteína acessória que atua através do recrutamento de fatores celulares do hospedeiro que participam e otimizam o processo replicativo. (28) Por fim, a nsP4 possui o domínio RNA polimerase dependente de RNA e é considerada a principal enzima do complexo de replicação, atuando na síntese e alongação do RNA viral. (55) Devido a essa participação crucial no processo de replicação do genoma viral, as proteínas não estruturais são consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos inibidores, visando a interrupção do processo de replicação e a consequente eliminação do vírus do organismo. (56)

O processo de infecção do CHIKV tem início com a interação com receptores da célula hospedeira, que até recentemente ainda não eram bem elucidados e as evidências apontavam para os glicosaminoglicanos, mucina-1, proibitina e fatores de adsorção. (28) No

entanto, Zhang e colaboradores (57) demonstraram que o CHIKV e outros Alfavírus artritogênicos como Ross River (RRV) e o Mayaro (MAYV), utilizam como receptor celular o Mxra8, que é uma molécula de adesão das células epiteliais, mielóides e mesenquimais. (57) Regiões específicas glicoproteína E2 interagem com o receptor promovendo a entrada da partícula viral e em seguida ocorre a internalização pelo processo de endocitose mediada por clatrina. No endossomo, a acidificação promove alterações conformacionais nas glicoproteínas de superfície, levando a dissociação dos heterodímeros E1-E2. Com isso, ocorre a exposição do *loop* de fusão da proteína E1, que irá promover a fusão do envelope viral com a membrana endossomal. Assim, o nucleocapsídeo entra em contato com o citoplasma celular e ocorre a sua desestruturação, liberando o material genético do vírus e dando início a tradução. (43)

Por ser um RNA viral de polaridade positiva, a sua tradução já ocorre de forma direta, gerando a poliproteína não estrutural, denominada P1234 (**Figura 2**). Através da atuação do domínio protease da nsP2, essa poliproteína é clivada em P123 e nsP4. Juntas, a P123 e nsP4, com auxílio de fatores do hospedeiro, formam o complexo de replicação inicial que ancora-se na membrana plasmática e realiza a síntese da fita complementar de polaridade negativa (43).

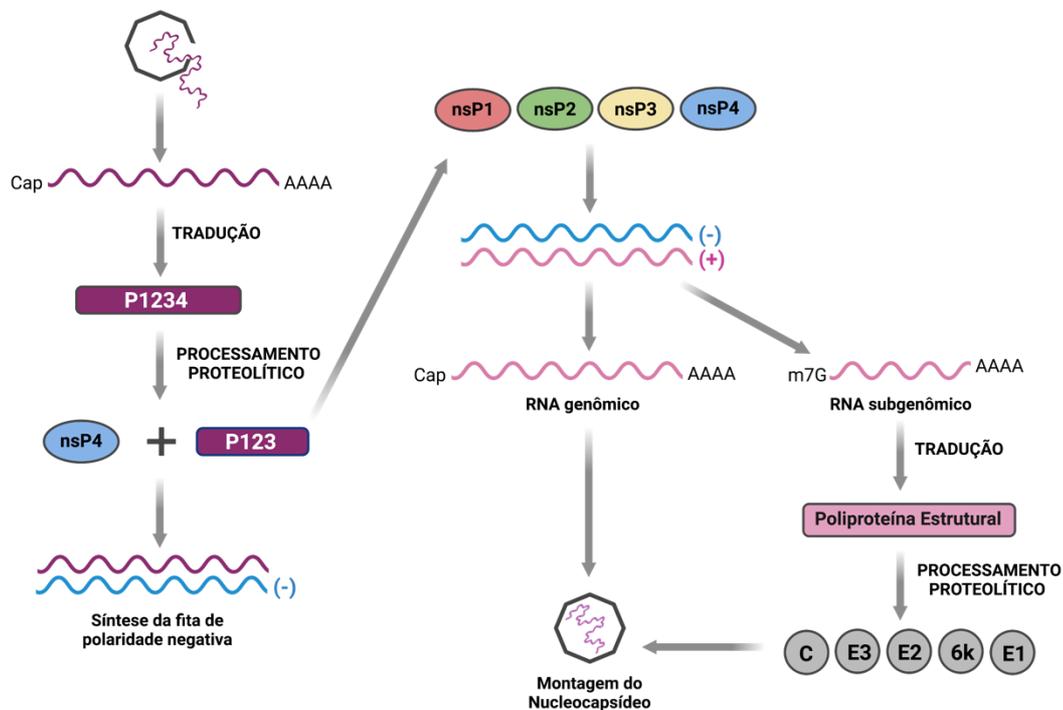


Figura 2 - Esquema resumido da replicação do vírus Chikungunya, evidenciando o processamento das poliproteínas e atuação das proteínas virais.

Fonte: Elaborada pela autora.

O acúmulo de P123 sinaliza para o completo processamento da poliproteína não estrutural, liberando as nsP1, nsP2, nsP3, que juntamente com a nsP4 iniciam a fase tardia da replicação, onde a fita negativa é utilizada como molde para a síntese da fita positiva e também do RNA subgenômico. (43) A partir desta etapa, o RNA subgenômico codifica a poliproteína estrutural, que posteriormente é clivada e libera as proteínas estruturais C, E3, E2, 6K e E1. A proteína C é a primeira a ser liberada por autoclivagem e interage com o genoma recém sintetizado, promovendo a estruturação do nucleocapsídeo que irá englobar a molécula de RNA viral. As proteínas de envelope são liberadas e translocadas para o retículo endoplasmático, onde ocorrem as modificações pós traducionais de maturação e glicosilação. Em seguida, essas proteínas estruturam-se, finalizando a formação das novas partículas virais completas que irão emergir através da membrana plasmática e infectar novas células. (43)

2.4 Proteína nsP4 RNA-Polimerase dependente de RNA do CHIKV como alvo para a busca de inibidores

A polimerase nsP4 é a principal enzima do complexo de replicação do CHIKV e atua na síntese e alongação do RNA viral, sendo a primeira proteína não estrutural a ser clivada durante o processamento da poliproteína viral. (55) De forma geral, assim como para as demais polimerases virais, a atividade catalítica consiste na ligação ao molde (template), iniciação (ligação do primer ao molde), incorporação dos trifosfatos de nucleosídeo (seguindo o pareamento de bases de Watson-Crick) e a alongação da fita filha complementar. (58) Para isso, o sítio ativo possui resíduos de ácido aspártico conservados e que estão coordenados a dois íons metálicos divalentes como Mg^{2+} ou Mn^{2+} , que são essenciais a atividade desta enzima. Esses resíduos fazem parte da sequência característica “GDD” (glicina- ácido aspártico- ácido aspártico) que é conservada em todas as polimerases virais. (58)

A nsP4 participa ativamente tanto da fase inicial quanto da fase tardia da replicação e a sua notória influência na seletividade do molde de RNA e na eficiência da síntese de RNA nos alphavirus foi evidenciada recentemente em um estudo publicado por Lello e colaboradores. (59) Além de desempenhar essas funções essenciais à replicação viral, acredita-se que a nsP4 também possua funções no reparo do genoma e interação com fatores do hospedeiro. (60)

Dessa forma, diante da relevância da atuação dessa enzima no processo de replicação do CHIKV, ela surge como um alvo atrativo na busca de novas moléculas inibidoras para o tratamento da infecção causada por esse vírus. (55) Apesar dessa importância, ainda não existe uma literatura tão ampla no que se refere à busca de inibidores tendo essa proteína

como alvo. Uma das possíveis razões seria a ausência de estrutura tridimensional da nsP4 do CHIKV resolvida experimentalmente, o que gera desafios em relação ao entendimento dos seus aspectos estruturais e desenho de inibidores específicos diretamente para esse alvo. (61) Além disso, as interações da nsP4 com as demais proteínas não estruturais e fatores do hospedeiro também não são completamente elucidadas, o que dificulta se pensar no desenho de inibidores capazes de atuar nas etapas de interação entre essas proteínas, como estratégia de interrupção da replicação. (54)

No entanto, um estudo recente publicado por Tan e colaboradores (62) reportou as estruturas cristalográficas dos domínios RdRp dos Alfavirus Ross River (RRV) (PDB ID:7F0S) e Sindbis (SINV) (PDB ID: 7VB4). Por pertencerem ao mesmo gênero do CHIKV e devido a alta identidade entre as polimerases desses vírus, certamente a disponibilização dessas estruturas proverá informações que irão auxiliar nos estudos com a nsP4 de CHIKV e dos demais Alfavírus. Somado a isso, os avanços nos métodos computacionais de predição de estruturas tridimensionais de proteínas, como os programas AlphaFold2 (63) e RoseTTAFold (64), certamente irão contribuir para avanços significativos nesta área e auxiliarão na busca e desenvolvimento de novos fármacos utilizando esses alvos.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste Capítulo I, é a elucidação de aspectos estruturais da proteína nsP4 do vírus CHIKV (nsP4-CHIKV) e a busca de moléculas ligantes para este alvo. Para isso, estudos integrados de biologia molecular, biologia estrutural e biofísica serão conduzidos visando identificar novos candidatos a fármacos antivirais. Para atingir o objetivo fundamental deste projeto foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Clonagem do gene codificante em vetores de expressão visando máxima expressão solúvel da nsP4-CHIKV;
2. Otimização das condições de expressão e purificação proteica;
3. Ensaio de cristalização;
4. Caracterização biofísica da proteína;
5. Triagem de candidatos a inibidores da nsP4-CHIKV;
6. Estudos de interação da nsP4-CHIKV com ligantes;
7. Ensaio celulares de inibição de replicação viral;
8. Publicação dos dados em revistas científicas internacionais.

4 METODOLOGIA

4.1 Clonagem e expressão em larga escala da nsP4-CHIKV

Com base na análise do genoma do CHIKV e comparações com outros Alfavírus já descritos, foi identificada a sequência para o fragmento gênico codificante da proteína nsP4-CHIKV. A região codificante (GenBank KP164572.1; PROT-ID AJY53709.1 – resíduos 118 to 611) foi sintetizada com códons otimizados para a expressão em *E. coli* e clonada no plasmídeo pUC57, que foi transformado em cepas bacterianas *E. coli* DH5 α . Para a expressão, foi realizada a subclonagem no vetor de expressão pET-SUMO, utilizando a metodologia de clonagem independente de ligação (LIC, do inglês *ligation independent cloning*) (65) e em seguida a transformação em cepas de *E. coli* Rosetta 2 (DE3). Essa construção utilizada codifica a nsP4-CHIKV (aa 118-611) com uma cauda de hexa-histidina (6xHis-tag) na região N-terminal, seguida por um sítio de clivagem da TEV protease (ENLYFQ/GAM) e a proteína de fusão SUMO (14 kDa). Após a transformação, a expressão em larga escala foi realizada em meio Terrific Broth (TB) e as culturas bacterianas foram crescidas sob agitação, a 37°C até que a densidade óptica a 600 nm (D.O._{600 nm}) atingisse 1,0. Na sequência, a expressão foi induzida por 1 mM de β -tiogalactopiranosídeo de isopropila (IPTG) e as culturas foram mantidas a 18°C por 20 h. Ao final do período de expressão, as células foram separadas por centrifugação e ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% de glicerol). Foi realizada a etapa de lise química utilizando 250 μ g/mL de lisozima e 10 U/mL de benzonase. Em seguida, as células foram submetidas a lise celular mecânica através de desmembramento ultrassônico (sonicação) e após isso, o lisado celular obtido foi centrifugado a 12.000 x g durante 30 min e com a temperatura mantida a 4°C, para a obtenção da fração solúvel.

4.2 Purificação da nsP4-CHIKV

Todas as etapas de purificação foram realizadas por métodos cromatográficos, utilizando sistema semi-automatizado ÄKTA Pure 25 (GE Healthcare) com monitoramento da absorbância em $\lambda = 280$ nm (UV) e da condutividade. A primeira etapa foi a cromatografia por afinidade a metal imobilizado (IMAC, do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) utilizando a coluna Histrap HP (GE Healthcare), pré-equilibrada com o tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% de glicerol). A fração solúvel, separada na centrifugação, foi passada na coluna utilizando uma bomba de eluição e em

seguida foi conectada ao AKTA para as etapas de lavagem e eluição. A etapa de eluição ocorreu com tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% de glicerol e 250 mM de imidazol) e a fração eluída foi coletada. A remoção do excesso de imidazol foi realizada através de uma etapa de diálise, na qual a proteína foi incubada durante 16h, a 4° C. Simultaneamente nesta incubação, foi realizada a clivagem da 6xHis-tag-SUMO, utilizando TEV protease (na proporção 1 mg de TEV protease para 20 mg de proteína) e 4 mM de 1,4-ditiotreitol (DTT). Após a clivagem, uma segunda etapa de cromatografia por afinidade foi realizada e a fração obtida foi concentrada para a realização da última etapa cromatográfica (gel filtração), utilizando a coluna XK 26/1000 Superdex 75 (GE Healthcare) pré-equilibrada com o tampão de gel filtração (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 5% glicerol).

As frações referentes aos picos mostrados no cromatograma foram coletadas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) para confirmar a pureza e análise de espectrometria de massas foi realizada para confirmar a presença da nsP4-CHIKV. As amostras finais de proteína foram concentradas utilizando concentradores MWCO (Vivaspin, Sartorius) com tamanho de corte de 30 kDa. A concentração da proteína foi determinada utilizando espectrofotômetro Nanodrop 1000 spectrophotometer, considerando as absorbâncias medidas a 280 nm e o coeficiente de extinção teórico de 36.495 M⁻¹cm⁻¹.

4.3 Avaliação de estabilidade

A estabilidade da nsP4-CHIKV em diferentes soluções tamponantes foi avaliada através da técnica de Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF, do inglês *Differential Scanning Fluorimetry*) em um termociclador Mx3005p qPCR System (Agilent). Foram utilizados os kits comercial *Solubility and Stability Screen HT* e *Additive Screen* (Hampton Research), cada um apresentando 96 diferentes condições. As descrições das composições das soluções destes kits encontram-se disponíveis em <https://hamptonresearch.com/product-Solubility-Stability-Screen-620.html> e <https://hamptonresearch.com/product-Additive-Screen-Additive-Screen-HT-27.html>, respectivamente. Além destas condições, foi montada uma matriz *in house* de condições tamponantes em placa, levando em consideração diferentes tampões (Tris-HCl, HEPES, PBS e Bicina) em diferentes pHs (7,5 / 8,0 / 8,5 / 9,0), presença/ausência de sais (NaCl) e presença/ausência de glicerol.

Para o ensaio de DSF, a concentração final da proteína utilizada foi 8,0 µM e foi adicionada a sonda hidrofóbica, SYPRO® *Orange Protein Gel Stain* (ThermoFisher

Scientific) na concentração final de 5X. As placas foram montadas com 20 μL das condições analisadas e 5 μL da solução de proteína com a sonda, totalizando 25 μL de volume de reação e foram submetidas a uma variação de temperatura de 25 a 74°C. Os dados foram tratados utilizando o *software* Origin Pro 9.5.1, seguindo o protocolo descrito por Niesen e colaboradores. (66)

4.4 Ensaios de cristalização

A nsP4-CHIKV purificada foi concentrada até atingir a concentração de 10 mg/mL (266 μM). Com o auxílio de um robô de cristalização Gryphon LCP (Art Robbins Instruments), foram montadas placas do tipo Intelliplate 96-3 (Art Robbins Instruments), utilizando a técnica de difusão de vapor em gota assentada e que foram mantidas a 18 °C e 4 °C. As triagens foram realizadas utilizando os *kits* comerciais Morpheus (Molecular Dimensions), Index HT (Hampton Research), Crystal Screen (Hampton Research), PACT++ (Hampton Research), PEGs (Hampton Research) e AmSO₄ Suite (Qiagen). As gotas foram montadas na proporção de 1:1 de proteína e solução dos *kits* comerciais, totalizando 0,6 μL . Os experimentos foram acompanhados em dias intercalados por 2 semanas e a partir de então, semanalmente e mensalmente.

4.5 Caracterização biofísica da nsP4-CHIKV

4.5.1 Cromatografia líquida de exclusão de tamanho acoplada a espalhamento de luz multiangular (SEC-MALS)

O experimento de cromatografia líquida de exclusão de tamanho acoplada a espalhamento de luz multiangular (SEC-MALS, do inglês *size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering*) foi realizado em tampão de corrida (50 mM Tris-HCl pH 8.0 e 200 mM NaCl), utilizando o volume de 50 μL de proteína purificada (concentração 1,5 mg/mL). A amostra foi injetada em um cromatógrafo 600 HPLC system (Waters) acoplado em linha com um detector UV, um aparato de espalhamento de luz multiangular mini DAWN TREOS (Wyatt Technology), uma coluna a Superdex 75 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) e o detector de índice de refração Optilab T-rEX (Wyatt Technology). Os detectores de espalhamento de luz foram normalizados com albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich) e o fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min. Os dados foram processados

utilizando ASTRA7 software (Wyatt Technology) com os seguintes parâmetros: índice de refração de 1,331, viscosidade do solvente de 0,890 cP e o incremento do índice de refração de 0,1850 mL/g. A solução de proteína foi centrifugada durante 10 minutos, com rotação de 10.000 x g e temperatura controlada de 4°C, imediatamente antes da injeção.

4.5.2 Dicroísmo Circular (CD)

Os experimentos de Dicroísmo Circular (CD, do inglês *circular dichroism*) foram realizados utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815 (JASCO Corporation, Easton, MD, USA) equipado com um módulo Peltier para o controle da temperatura. Os espectros foram obtidos a cada 0,2 nm, no intervalo de comprimento de onda de 190 a 280 nm, utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm, velocidade de varredura de 50 nm/min e a temperatura foi mantida a 20 °C. Para melhorar a razão sinal/ruído, os espectros resultantes foram obtidos através de 8 acumulações.

A desconvolução dos espectros de CD foi realizada através do *website* DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>) (67). Para as análises do espectro da nsP4-CHIKV, foram utilizados os métodos SELCON3 (68), CONTIN (69) e CDSSRT (70), em conjunto com as bases de dados *Set 4* (70), *Set 7* (70) e SP175 (71). O desvio quadrático médio normalizado (NRMSD, do inglês *Normalized Root Mean Square Deviation*) (72) foi o parâmetro utilizado para avaliar a qualidade dos ajustes dos espectros teóricos calculados pelos métodos em relação ao espectro experimental obtido da nsP4-CHIKV.

Para os estudos de desnaturação química, os mesmos parâmetros de aquisição dos espectros foram utilizados, realizando uma titulação de ureia, variando de 0,5 M a 10,0 M. Para os estudos de desnaturação térmica, a faixa de variação de temperatura foi de 10 a 80 °C, com taxas de aquecimento de 0,5 °C/minuto e 1,0 °C/minuto e foi realizado o monitoramento dos valores de elipticidade em 222 nm. Os experimentos de CD foram realizados em triplicata e foi utilizada a proteína nsP4-CHIKV na concentração de 2 µM diluída em água ultra purificada, visando minimizar as interferências de absorção referente aos íons cloretos e aminas presentes no tampão de gel filtração. Utilizando o *software* CDTool, os espectros de CD da proteína foram subtraídos dos espectros dos controles (água e tampão) e normalizados com relação a concentração, comprimento da cubeta e número de ligações peptídicas da proteína, sendo apresentados em delta épsilon ($\Delta\epsilon$). Os gráficos e tratamentos dos dados foram realizados utilizando o software Origin Pro 9.5.1.

4.5.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Experimentos de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foram realizados em colaboração com o Prof. Luis Guilherme Mansor Basso (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, RJ). As análises foram realizadas em um microcalorímetro MicroCal VP-DSC (Microcal, Northampton, MA, USA) e as concentrações de proteína utilizada foram de 7,4 μM , 9,3 μM e 12 μM , diluídas em tampão de gel filtração (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM de NaCl e 5% de glicerol). As amostras de proteína e referência (tampão de gel filtração) foram degaseificadas durante 5 minutos previamente as medidas. Para o experimento, foram utilizadas diferentes taxas de aquecimento (8°C/h, 13°C/h, 33°C/h, 64°C/h) em um intervalo de temperatura de 10 a 70°C para a observação do processo de transição. A análise dos termogramas, bem como a subtração da resposta do tampão, correção de linha de base e integração dos picos calorimétricos referentes às transições de fase, foram realizadas utilizando o *software* MicroCal Origin.

4.6 Ensaios de interação com compostos

4.6.1 Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF)

Os ensaios de interação da nsP4- CHIKV com compostos foram realizados através de Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF, do inglês *Differential Scanning Fluorimetry*), utilizando uma série de 12 compostos provenientes do projeto OpenZika e que foram fornecidos pela Profa. Dra, Carolina Horta Andrade (Universidade Federal de Goiás, Brasil). A concentração final da proteína utilizada foi 8,0 μM e foi adicionada a sonda hidrofóbica, SYPRO® *Orange Protein Gel Stain* (ThermoFisher Scientific) na concentração final de 5X. Os compostos foram adicionados na concentração final de 80 μM e o DMSO 5% foi utilizado como controle negativo. Os experimentos foram realizados em um termociclador Mx3005p qPCR System (Agilent), com uma variação de temperatura de 25 a 74°C. Os dados foram tratados utilizando o *software* Origin Pro 9.5.1, seguindo o protocolo descrito por Niesen e colaboradores. (66)

4.6.2 Termoforese em Microescala (MST)

Os ensaios de Termoforese em Microescala (MST, do inglês *MicroScale Thermophoresis*) foram realizados utilizando o equipamento Monolith® NT.115

(Nanotemper Technologies) e capilares do tipo Premium (Nanotemper Technologies). A nsP4-CHIKV foi marcada nos resíduos de cisteína, utilizando a sonda reativa NT-647-Maleimide dye (Nanotemper Technologies) do *kit* Monolith NTTM Protein Labeling Kit RED-MALEIMIDE. O procedimento de marcação da proteína com a sonda foi realizado de acordo com as recomendações do manual do fornecedor e a eficiência da marcação foi medida através do sinal de fluorescência gerado pelo equipamento. A concentração final de proteína utilizada no ensaio foi de 25 nM. Para os ensaios com o composto LabMol-309, a checagem de ligação (*binding check*) foi realizada com o composto na concentração final de 100 μ M e para a obtenção das curvas de afinidade o composto foi diluído serialmente de 200 μ M a 0,012 μ M. A constante de dissociação (K_D) foi obtida através do ajuste da curva de afinidade a função de Hill, utilizando o *software* GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software).

4.6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O assinalamento de ressonância do composto LabMol-309 foi realizado utilizando um espectrômetro Bruker Avance III 600 MHz. A aquisição dos espectros de ^1H - ^{13}C -HSQC, COSY e TOCSY foi realizada a 298K, utilizando 1mM do LabMol-309, diluído em água deuterada D_2O . Os estudos de interação da nsP4-CHIKV com o composto LabMol-309 foram realizados em um e a proteína foi utilizada na concentração de 3 μ M, diluída em tampão de ensaio constituído por 20 mM (^2H) $_{11}$ -Tris-HCL pH 7.5, 200 mM NaCl. O composto LabMol-309 foi utilizado na concentração final de 250 μ M, diluído previamente em DMSO deuterado e em seguida diluído no mesmo tampão da proteína para os ensaios. Os espectros ^1H unidimensionais foram adquiridos para as amostras do composto na presença e na ausência da proteína. Foi realizada a sobreposição destes e as diferenças nos deslocamentos químicos foram medidas e analisadas. O processamento dos dados e análises foram realizadas utilizando o *software* TopSpin 4.09.

4.7 Modelo tridimensional da nsP4-CHIKV e análises estruturais

A sequência completa da nsP4-CHIKV (resíduos 1 a 611) foi utilizada para gerar o modelo tridimensional utilizando o *software* AlphaFold2, desenvolvido pela DeepMind (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (63). Para os cálculos de *docking* molecular, o modelo da nsP4-CHIKV foi refinado estruturalmente utilizando o servidor GalaxyRefine (73). As cargas superficiais foram calculadas através do método *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS) (74) e a análise de resíduos conservados foi realizada através do ConSurf, seguindo os

parâmetros padrões do servidor (75). O programa Pymol (76) foi utilizado para a elaboração das imagens.

4.8 *Docking* molecular da nsP4-CHIKV com o LabMol-309 e simulações de dinâmica molecular (DM)

Os cálculos de *docking* foram realizados em colaboração com a Dra. Melina Mottin (Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Brasil). Foi utilizado o servidor DockThor VS web (77-78), focando na região do sítio ativo da nsP4-CHIKV (resíduos Asp371 e Asp466). As estruturas da nsP4-CHIKV e do composto LabMol-309 foram preparadas utilizando as ferramentas Protein Preparation Wizard (79) e LigPrep. (80) O *grid* de 20 Å foi centralizado no sítio ativo, com as coordenadas x, y e z de -27.84 Å, 12.89 Å e 28.25 Å, respectivamente. O modo de busca precisa de algoritmo foi selecionada nas configurações padrão dos parâmetros de algoritmo genético, com o modo de *soft docking* ativado. O servidor PLIP (81) foi utilizado para analisar os padrões de proteína-ligante (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, cátion π , π -stacking, interações com água e pontes salinas). O servidor Poseview (82-83) foi utilizado para gerar o diagrama de interação 2D e o programa VMD foi utilizado para renderizar as imagens em 3D. (84)

As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso (Universidade Estadual Paulista – UNESP-IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brasil). As posições iniciais do complexo nsP4-CHIKV-LabMol-309 foram provenientes dos resultados de *docking* e a parametrizações de topologia do ligante (Molid 814093) foram obtidas a partir do servidor ATB. (85) As simulações de DM foram realizadas utilizando o pacote GROMACS versão 5.0.7. (86) O sistema contendo o complexo proteína-ligante foi modelado com o campo de força GROMOS54A7 (87) e modelo de água SPC (88), utilizando uma caixa cúbica solvatada com 200 mM de NaCl. As simulações foram realizadas com *ensemble* NPT a 25 °C e pressão de 1.0 bar, utilizando termostato de Berendsen modificado com $\tau_T = 0.1$ ps e barostato de Parrinello-Rahman com $\tau_P = 2.0$ ps e compressibilidade = $4.5 \times 10^{-5} \cdot \text{bar}^{-1}$. Um valor de corte de 12 Å foi utilizado para os potenciais de Lennard-Jones e Coulomb potentials e interações eletrostáticas de longa distância foram calculadas utilizando o algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME). (89) A minimização de energia foi realizada através do integrador *steepest descent integrator* e algoritmo de gradiente conjugado, utilizando $1000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$ como critério de força máxima. Cem mil passos de DM foram realizados para cada equilíbrio NVT e NPT

aplicando constantes de força de $1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ para todos os átomos pesados do complexo proteína-ligante. Ao final da preparação, uma simulação de DM de 100 ns do complexo foi realizada para a aquisição dos dados. Em seguida, a trajetória foi alinhada e analisada de acordo com: RMSD dos átomos da cadeia principal para a proteína e átomos sem hidrogênio do ligante, número de ligações de hidrogênio (distância de corte de 3,5 Å e ângulo máximo 30°) entre a proteína e o ligante, e número de contatos <0,6 entre todos os átomos da proteína e do ligante.

4.9 Ensaios celulares

4.9.1 Células e Vírus

Células BHK-21 foram adquiridas do The Global Bioresource Center (ATCC) e foram mantidas em meio DMEM (do inglês, Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 100U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 1% da diluição do estoque de aminoácidos não essenciais e 10% de soro fetal bovino (SFB), em uma incubadora de CO₂ com umidade de 5% e mantida a 37 °C. A linhagem celular BHK-21-Gluc-nSP-CHIKV-99659, contendo o replicon de CHIKV expressando *Gaussia* luciferase (Gluc) como gene reporter, foi mantido em meio DMEM 10% de SFB com 500 µg/ml de G418 (Sigma-Aldrich). A construção do replicon de CHIKV inclui um promotor de bacteriófago T7, seguido pela região viral 5' UTR, a sequência codificante da nsP1-nsP4, o promotor subgenômico (Sg), seguido pela sequência GLuc e o cassete de expressão contendo a sequência de ubiquitinação (Ubi), o gene de resistência a Neomicina (Neo) e a região viral 3' UTR. Para os ensaios antivirais, o CHIKV expressando o gene reporter *nanoluciferase* (CHIKV-*nanoluc*), baseado no isolado de CHIKV LR2006OPY1 (genótipo *East/Central/South African*), foi produzido, ressuscitado e titulado como descrito anteriormente (90,91).

4.9.2 Ensaios utilizando sistema Replicon de CHIKV

Os ensaios utilizando o sistema replicon de CHIKV foram realizados em colaboração pela Dra. Rafaela Sachetto Fernandes (Universidade de São Paulo – USP-IFSC, São Carlos, SP, Brasil). O composto LabMol-309 na concentração estoque de 200 mM (em 100% de DMSO) foi diluído em meio de ensaio para uma concentração final de 1% (v/v) de DMSO e foi avaliado de maneira concentração-dependente para determinar sua eficácia (EC₅₀) e

concentração citotóxica (CC_{50}), conforme previamente descrito. (92) Foram semeadas em placa de 96 poços aproximadamente 2×10^4 células/poço em meio DMEM 10% SFB. Após 16 horas de incubação a 37°C e 5% de CO_2 , o meio foi substituído por DMEM fresco suplementado com 2% de SFB e o composto foi adicionado às células em diluição seriada fator 2. Após uma incubação de 48 horas, 40 μL do sobrenadante das células contendo Gluc secretada foram misturados com 50 μl de reagente de ensaio de Renilla luciferase (Promega). A atividade da Gluc foi medida usando a plataforma de detecção multimodular SpectraMax i3 (Molecular Devices). Para o controle negativo (0% de inibição), foram usadas células replicon em 1% de DMSO. A concentração do composto necessária para inibir 50% da atividade da Gluc (EC_{50}) foi estimada utilizando o software OriginPro 9.0. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio de proliferação celular baseado MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), conforme previamente descrito. (93) A concentração do composto necessária para causar 50% de citotoxicidade (CC_{50}) foi estimada utilizando o software OriginPro 9.0. As curvas de concentração-resposta foram realizadas duas vezes em duplicatas. Os valores de EC_{50} e CC_{50} foram utilizados para determinar o índice de seletividade ($SI = CC_{50}/EC_{50}$) do composto.

4.9.3 Ensaios de infecção utilizando CHIKV-nanoluc

Os ensaios antivirais utilizando vírus repórter foram realizados em colaboração, pelo grupo da Profa. Ana Carolina Gomes Jardim (Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Minas Gerais, Brasil). Para avaliar o efeito antiviral do LabMol-309, células BHK-21 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^4 células por poço, em placas de 48 poços durante 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com o LabMol-309, em diluição seriada de fator 2, variando de 10.78 a 100 μM na presença e ausência do CHIKV-nanoluc a uma multiplicidade de infecção (MOI, do inglês *multiplicity of infection*) de 0,1 PFU/células. As amostras foram ressuspensas utilizando tampão de lise de Renilla-luciferase (Promega) 16 horas após infecção (h.p.i) e os níveis de replicação viral foram quantificados através da medição da atividade *nanoluciferase* utilizando o kit de Renilla luciferase (Promega).

4.9.4 Ensaios de viabilidade celular em células BHK-21

A viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], conforme descrito anteriormente (90,91). Após o ensaio, o meio foi substituído com a solução de MTT a 1mg/mL e as células foram incubadas durante

30 minutos. Em seguida, a solução de MTT foi removida e substituída por 300 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi medida em 490 nm, utilizando um leitor de microplacas Glomax microplate reader (Promega®). A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação $(T/C) \times 100\%$, onde T e C representam a densidade óptica média das células tratadas (incubadas com LabMol-309) e não tratadas (células grupo controle com DMSO 0.1%), respectivamente. As concentrações citotóxicas de 50% (CC_{50}) e concentração efetiva de 50% de inibição (EC_{50}) foram calculadas utilizando GraphPad Prism 8.0.0 (GraphPad Software, www.graphpad.com). Os valores de CC_{50} e EC_{50} foram usados para calcular o índice de seletividade ($SI = CC_{50}/EC_{50}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da nsP4-CHIKV purificada

O protocolo descrito para as etapas de clonagem e expressão, bem como o protocolo adotado para a purificação da nsP4-CHIKV foram efetivos e possibilitaram a obtenção da proteína pura. A nsP4-CHIKV purificada é formada por 492 aminoácidos e tem peso molecular teórico de 54,54 kDa. Esta construção abrange todo o domínio RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) (**Figura 3A**), que é responsável pela sua função enzimática e onde estão localizados os resíduos de ácido aspártico catalíticos (correspondendo aos Asp371 e Asp466). (58) O resíduo Asp466 está localizado no motivo GDD, que é uma sequência altamente conservada entre as polimerases virais. (58)

A proteína foi obtida de forma solúvel e os contaminantes foram eliminados ao longo das três etapas de purificação (**Figura 3B**). Na última etapa, de gel filtração, foi possível observar o aparecimento de dois picos (P1 e P2) no Cromatograma, com resolução suficiente para a separação, sendo o segundo pico (P2), referente a nsP4-CHIKV (**Figura 3C**). As frações referentes aos picos foram coletadas e confirmadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida. As bandas do gel referente aos P1 e P2 foram destacadas e submetidas a tratamento específico e tripsinização para a realização de espectrometria de massas. Através desta análise adicional foi possível confirmar a presença da nsP4-CHIKV pura no segundo pico eluído, bem como a identificação do primeiro pico como sendo referente à proteína chaperona do tipo HtpG proveniente da *E. coli*, utilizada como sistema de expressão.

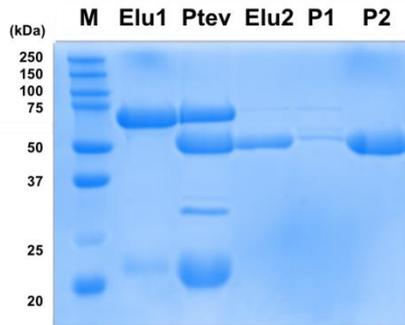
A

```

ESAVAACNEFLARNYPTVSSYQITDEYDAYLDMVDGSESLDRATFNPSKLRSPKQHAYHAPSIRSAVPS
PFQNTLQNVLAAATKRNCNVTQMRELPTLDSAVFNVECFKKFACNQEYWEFFAASPIRITTENLTTYVTKL
KGPKAAALFAKTHNLLPLQEVPMDFRTVDMKRDVKVTPGTHTEERPKVQVIQAAEPLATAYLTCGIHRELV
RRLNAVLLPNVHTLFDMSAEDFAIIAAHFKPGDTVLETIASFDKSQDDSLALTALMLLEDLGVDHSLLD
LIEAAFGEISSCHLPTGTRFKFGAMMKS GMFLTLFVNTLLNITIASRVLEDRLTKSACAAFI GDDNI IHGV
VSDELMAARCATWMNMEVKI IDAVVSQKAPYFCGGFILHDIVTGTACRVADPLKRLFKLGKPLAAGDEQDE
DRRRALADEVVRWQRTGLIDELEKAVYSRYEVQGISVVVMSMATFASSRSNFEKLRGPPVVTLYGGPK

```

B



C

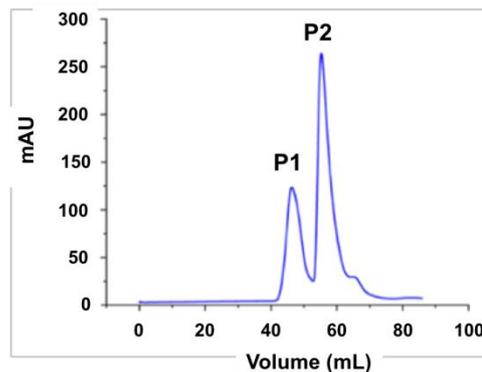


Figura 3 - A) Sequência de aminoácidos da proteína nsP4-CHIKV. Em vermelho, região da sequência aonde está localizado o domínio RdRp. Os resíduos de ácido aspártico catalíticos (Asp371 e Asp466) estão destacados em verde e a sequência GDD está marcada com um retângulo roxo. B) Gel de acrilamida 12,5% das frações eluídas durante a gel filtração: M, marcador de peso molecular; Elu1, eluição da proteína na primeira etapa de afinidade; Ptev, fração após a clivagem com a TEV protease; Elu2, eluição da proteína na segunda etapa de afinidade; P1, fração correspondente ao primeiro pico da gel filtração; P2, fração correspondente ao segundo pico da gel filtração, onde está presente a nsP4 CHIKV purificada (54,54 kDa). C) Cromatograma obtido na etapa de purificação de gel filtração.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Avaliação de estabilidade

As avaliações iniciais de estabilidade da nsP4-CHIKV em solução foram realizadas através da técnica de DSF, também conhecida como *ThermoFluor*. Esta técnica possibilita a obtenção de informações sobre o comportamento da proteína frente a diferentes tampões e presença de aditivos ou ligantes, visando a identificação de condições que possibilitem uma melhora de sua estabilidade. (94)

No experimento, a proteína é colocada em contato com a solução a ser avaliada, juntamente com uma sonda hidrofóbica fluorescente e é submetida a um aumento gradual de temperatura. Esse aumento da temperatura vai gerando o desenovelamento da proteína e expondo as suas regiões hidrofóbicas, que no estado enovelado estavam internalizadas. A sonda hidrofóbica fluorescente liga-se a essas regiões agora expostas, gerando um sinal de fluorescência que é detectado. Dessa forma, o ambiente que a proteína se encontra (tampão e/ou presença de aditivos) influencia diretamente na temperatura que irá ocorrer o desenovelamento, pois pode tornar a proteína mais ou menos estável. (94)

As intensidades de fluorescência obtidas no ensaio para as condições avaliadas para a nsP4-CHIKV foram plotadas em função da temperatura, obtendo uma curva sigmoideal. Esses dados foram tratados utilizando o ajuste de Boltzmann e dessa forma foi possível obter os valores de temperatura de *melting* aparente (T_m), que é a temperatura de transição entre os estados enovelado e desenovelado. (94) Portanto, condições na qual ocorre um aumento no valor da T_m , estão relacionadas a uma melhora da estabilidade, pois significa que a proteína necessitou de um maior aumento na temperatura para desenovelar.

O T_m inicial da nsP4-CHIKV em seu tampão de gel filtração foi de 38,7°C, então as novas T_m obtidas nas condições testadas foram subtraídas deste valor inicial, obtendo a diferença de temperatura (ΔT_m), como mostrado na **Tabela 1**. Foram consideradas variações de temperatura superior a 1,5°C e foram desconsideradas as condições nas quais ocorreram diminuições em relação ao T_m inicial.

Tabela 1 - Condições tamponantes e de aditivos utilizadas no ensaio de DSF. O ΔT_m é a diferença entre o T_m da nsP4 CHIKV inicial (em tampão de gel filtração) e a nova T_m apresentada na condição avaliada.

Kit	Condição tamponante / aditivo	ΔT_m
<i>Solubility and Stability Screen HT</i> (Hampton Research)	A2: 0.2 M Acetato de sódio tri-hidratado pH 4.5	4,8 °C
	B8: 0.2 M HEPES pH 7.5, 0.2 M cloreto de sódio	1,9 °C
	G2: 0.2 M Acetato de sódio tri-hidratado pH 4.5, 2.0 M cloreto de sódio	1,5 °C
<i>Additive Screen</i> (Hampton Research)	E6: 30% p/v D-(+)-Glicose mono-hidratada	2,0 °C
	E7: 30% p/v Sacarose	2,0 °C
	E8: 30% p/v Xilitol	2,0 °C
	E9: 30% p/v D-Sorbitol	2,1 °C
	F2: 30% p/v Glicerol	2,0 °C
	F3: 3.0 M NDSB-195	1,8 °C
	G1: 30% p/v N-óxido de Trimetilamina di-hidratado	3,0 °C
<i>Kit de tampões</i> (<i>In house</i>)	A2: 50 mM Tris-HCl pH 7.5 + 5% glicerol	1,8 °C
	A8: 20 mM Tris-HCl pH 7.5 + 5% glicerol	1,9 °C
	B2: 50 mM Tris-HCl pH 8.0 + 5% glicerol	1,9 °C
	D8: 20 mM HEPES pH 7.5 + 5% glycerol	2,0 °C
	Água MilliQ	1,9 °C

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos resultados obtidos para o *kit Additive Screen* (Hampton Research) foi possível constatar que as condições que apresentaram elevação na T_m da nsP4-CHIKV apresentam aditivos do tipo osmólitos, como a glicose, sacarose, sorbitol, glicerol e N-óxido de trimetilamina (TMAO). Os osmólitos, também chamados de agentes cosmotrópicos, são solutos orgânicos que possuem a capacidade de elevar a energia livre de desnaturação, estabilizando estruturas proteicas em situações como de aumento da temperatura. (95)

Acredita-se que o mecanismo pelo qual isso ocorre em uma solução proteica onde foi adicionado o osmólito consiste na competição deste agente com as moléculas de água pela proteína. (96) Sabe-se que a interação preferencial da proteínas ocorre com as moléculas de água e não com o osmólito, que será excluído da superfície da proteína, caracterizando um fenômeno denominado efeito osmofóbico. (97-98) Dessa forma, essa competição eleva a energia livre de hidratação tanto no estado nativo quanto no estado desnaturado, porém neste último a elevação será maior pois neste estado a proteína encontra-se mais exposta ao solvente devido a descompactação estrutural, requerendo maior energia para o processo de solvatação. Como consequência disso, ocorre um deslocamento do equilíbrio dos estados a favor do estado nativo, que requer uma menor energia para o processo de solvatação devido a sua maior compactação estrutural e menor superfície de exposição. (99) Logo, a presença de osmólitos em soluções proteicas gera o favorecimento do estado nativo em relação ao estado desnaturado, contribuindo então para o aumento da estabilidade da proteína. (96)

Na avaliação das condições do *kit Solubility and Stability Screen HT* (Hampton Research) a elevação da T_m superior a $1,5^\circ\text{C}$ ocorreu em três das noventa e seis condições avaliadas, mostrando que a utilização do tampão acetato de sódio pH 4,5 (condição A2 do kit) forneceu o maior aumento na T_m dentre todas as condições avaliadas. Comparando a condição deste mesmo tampão adicionando cloreto de sódio (condição G2 do kit) é possível constatar que a adição de sal diminui de forma significativa a estabilidade da nsP4-CHIKV. O tampão HEPES com presença de cloreto de sódio também apresentou uma elevação na T_m , entretanto o uso deste tampão na purificação da nsP4-CHIKV não se mostrou eficiente pois causou a precipitação da proteína em altas concentrações.

O fato de a ausência de sal favorecer a estabilidade térmica da nsP4-CHIKV foi mostrado também na avaliação das condições do *kit* de tampões (*in house*), onde os tampões que apresentaram melhores respostas foram aqueles nos quais não foi adicionado o cloreto de sódio. Dessa forma, é possível inferir que a força iônica do meio possui uma contribuição importante na estabilidade. Adicionalmente, a presença de glicerol também foi favorável para a estabilidade da nsP4-CHIKV, concordando com os resultados da condição F2 do *kit Additive Screen* onde a presença deste aditivo em um maior percentual gerou elevação da T_m . Também foi observada uma melhora na estabilidade da proteína em água MilliQ, onde o T_m observado para essa condição concordou com o valor obtido na desnaturação térmica da nsP4 CHIKV por dicroísmo circular (dado que será discutido na seção 5.4.2), onde o experimento foi realizado com a proteína solubilizada em água e com quantidades mínimas de sal.

5.3 Ensaio de cristalização

Os ensaios de cristalização da nsP4-CHIKV foram realizados utilizando *kits* comerciais de triagem, sendo que no total aproximadamente 2000 condições cristalizantes foram testadas. Entretanto, durante o tempo de duração deste projeto, não foi possível a obtenção de cristais viáveis para serem encaminhados para experimentos de Difração de Raios-X. Além disso, até o momento, a estrutura tridimensional da nsP4-CHIKV ainda não foi resolvida e depositada em banco de dados.

5.4 Caracterização biofísica

5.4.1 *Cromatografia líquida de exclusão de tamanho acoplada a espalhamento de luz multiangular (SEC-MALS)*

A caracterização de proteínas em solução é uma etapa importante dos estudos com essas macromoléculas, sendo considerada como um controle de qualidade e que irá determinar se a amostra produzida está adequada para os demais experimentos. (100) Além da confirmação da pureza de uma amostra, outros parâmetros como massa molecular, estado oligomérico, agregações e formação de heterocomplexos, também são informações relevantes e que devem ser verificadas. Para isso, um dos métodos amplamente utilizados é o SEC-MALS, que permite a análise da proteína em seu estado nativo, diretamente da solução de tampão em que se encontra. O SEC-MALS consiste na combinação da cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) com o espalhamento de luz multiangular (MALS), e assim, através das medidas realizadas em cada volume de eluição, é possível determinar se o pico eluído é homogêneo e também diferenciar entre distribuições de peso molecular fixo ou que estão em equilíbrio dinâmico. (101)

Foi realizado o experimento de SEC-MALS da amostra de nsP4-CHIKV obtida na purificação e os resultados mostraram um baixo índice de polidispersão e massa molecular de 60 ± 1 kDa (**Figura 4**). A proximidade desse valor experimental com o valor teórico de massa molecular da proteína sugere que o estado monomérico é predominante e a amostra encontra-se homogênea nas condições experimentais avaliadas.

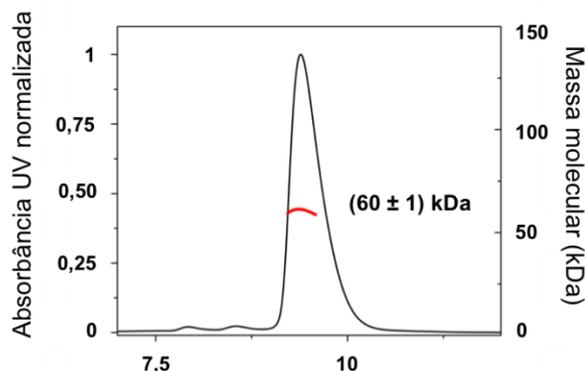


Figura 4 - Análise de SEC-MALS para a nsP4-CHIKV em solução. A proximidade da massa molecular estimada de (60 ± 1) kDa com a massa molecular teórica da proteína sugere a predominância do estado monomérico.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.2 Dicroísmo Circular (CD)

O CD foi utilizado para a caracterização estrutural da nsP4-CHIKV e consiste em um método biofísico capaz de fornecer informações sobre o perfil de estruturas secundárias, dinâmica de enovelamento e interação de proteínas com outras moléculas. De forma geral, a técnica fundamenta-se em uma absorção desigual da luz circularmente polarizada no sentido de mão direita (sentido horário, E_R) e sentido de mão esquerda (sentido anti-horário, E_L) por moléculas assimétricas, como as proteínas. (102) Os resultados de CD são reportados em unidades de delta épsilon ($\Delta\epsilon$), que é a diferença na absorbância de E_R e E_L pela molécula assimétrica, ou em graus de elipticidade, que é uma unidade definida como o ângulo no qual a tangente é a razão e entre o eixo menor e o maior da elipse $[\theta]$.

Assim, a técnica de CD é utilizada na determinação da estrutura secundária de proteínas, uma vez que diferentes elementos estruturais possuem espectros de CD característicos. (102) Para a nsP4-CHIKV, o espectro de CD obtido mostra que a proteína exibe mínimos na região de 208 nm e 222 nm (**Figura 5**), sugerindo a predominância de estruturas secundárias em hélice.

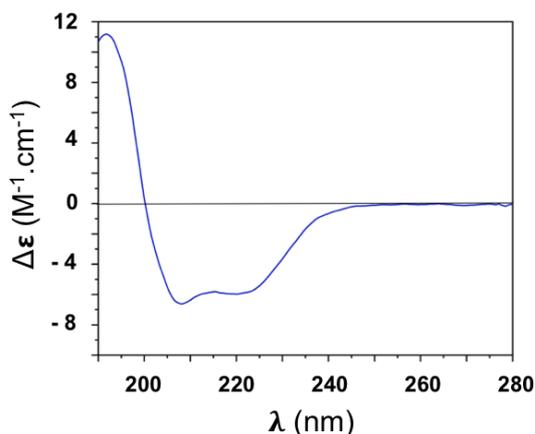


Figura 5 - Perfil de estrutura secundária da nsP4 de CHIKV obtida por CD.
Fonte: Elaborada pela autora.

De forma a obter uma análise quantitativa do dado adquirido por CD, foi realizada a deconvolução espectral para gerar uma estimativa do conteúdo das estruturas secundárias que compõem a nsP4 CHIKV. O princípio básico envolvido neste tipo de estimativa é que o espectro de CD da proteína pode ser expresso como uma combinação linear dos espectros de cada componente individual de estrutura secundária. (70) Para isso, o *website* DICHROWEB foi utilizado para deconvoluir a curva de CD obtida da nsP4-CHIKV. Este servidor utiliza diferentes algoritmos e bases de dados de proteínas para fornecer análises de predição de conteúdo de estrutura secundária a partir de espectros experimentais. (67) Para esta análise, foram utilizados três diferentes métodos combinados a três diferentes bases de dados, visando melhorar a confiabilidade dos resultados gerados.

Os resultados obtidos estão mostrados na **Tabela 2**, onde os espectros teóricos calculados para cada método foram ajustados ao espectro experimental da nsP4-CHIKV, e foi realizada uma média dos valores estimados de frações de estruturas secundária a partir de cada base de dado utilizada.

Tabela 2 - Métodos utilizados na desconvolução do espectro de CD da nsP4 CHIKV utilizando diferentes bases de dados espectrais de proteínas. O conteúdo de estrutura secundária para cada par método-base é apresentado na forma de fração de hélices (H), folhas (F), voltas (T, do inglês *turns*), estruturas irregulares ou desordenadas (U, do inglês *unordered*) e NRMSD.

Método	Base	H	F	T	U	NRMSD
SELCON3	Set 4	0,565	0,070	0,139	0,251	0,194
	Set 7	0,583	0,059	0,146	0,254	0,198
	SP175	0,536	0,075	0,111	0,272	0,114
	Média	0,561 ± 0,023	0,068 ± 0,008	0,132 ± 0,018	0,259 ± 0,011	
CONTIN	Set 4	0,552	0,053	0,149	0,245	0,037
	Set 7	0,559	0,047	0,147	0,248	0,037
	SP175	0,536	0,075	0,114	0,274	0,037
	Média	0,549 ± 0,011	0,058 ± 0,014	0,136 ± 0,019	0,255 ± 0,015	
CDSSRT	Set 4	0,610	0,070	0,100	0,220	0,012
	Set 7	0,630	0,050	0,090	0,230	0,012
	SP175	0,560	0,070	0,100	0,270	0,009
	Média	0,600 ± 0,036	0,063 ± 0,011	0,096 ± 0,005	0,240 ± 0,026	

Fonte: Elaborada pela autora.

A definição do melhor ajuste foi determinada a partir da análise do parâmetro NRMSD, que apresenta valores entre 0 e 1, sendo considerado o ajuste satisfatório quanto mais se aproximar de 0 e insatisfatório quanto mais próximo de 1. (72) De forma geral, valores de NRMSD inferiores a 0,1 são indicativos de bons ajustes, enquanto valores superiores a 0,2 sugerem que o método escolhido não seja apropriado para a proteína analisada. Sendo assim, o método CDSSRT apresentou NRMSD de 0,009 para a base de dados SP175 e de 0,012 para os Sets 4 e 7, sendo considerado o ajuste mais adequado e assim, o mais representativo do conteúdo de estrutura secundária da nsP4-CHIKV. Esse método foi desenvolvido por Johnson (1988) e é resultado da combinação de características de outros métodos já descritos, porém com o diferencial de fornecer bons resultados de análises com um número mínimo de proteínas de referência necessárias, que são selecionadas de forma randômica das bases de dados. (103)

Em relação as bases de dados utilizadas, A SP175 é composta por mais de 70 proteínas globulares (71) e apresentou o melhor ajuste (NRMSD 0,009) quando combinada ao método CDSSRT. As bases Set 4 e 7 são formadas por 37 proteínas e são otimizadas para

análises em comprimento de onda de 240 a 190 nm (104), e ambas também apresentaram um ajuste satisfatório (NRMSD 0,012) e convergência nos valores obtidos para as frações de estrutura secundária quando comparadas ao resultado da base SP175.

Portanto, a partir destes resultados obtidos, o percentual de conteúdo de estruturas secundárias para a nsP4-CHIKV foi de aproximadamente 60% de hélices, 6,3% de folhas, 9,6% de voltas e 24% de estrutura desordenada.

Além da determinação do perfil e estimativa do conteúdo de estrutura secundária de uma proteína, a técnica de CD também possibilita a obtenção de informações referentes à dinâmica estrutural de uma proteína quando submetida a determinadas condições, como a elevação da temperatura. Assim, considerando que uma proteína em seu estado enovelado possui alta assimetria de elementos de estrutura secundária e apresenta um espectro de CD característico, pode-se afirmar que quando ela sofre desenovelamento, essas estruturas ordenadas são perdidas, levando a uma mudança no perfil de CD. (105)

Quando essas mudanças ocorrem em função de uma elevação na temperatura, as alterações podem ser utilizadas para determinar os parâmetros termodinâmicos de desenovelamento da proteína, que são: a entalpia de van't Hoff (ΔH), a entropia de desenovelamento (ΔS), a temperatura da transição entre os estados nativo e desenovelado ou temperatura de *melting* (T_m) e a energia livre de enovelamento (ΔG). (105) Para isso, a termodinâmica do desenovelamento proteico pode ser estudada tanto através do monitoramento da elipticidade em um único comprimento de onda quanto através da coleta de espectros completos em função das temperaturas avaliadas. (105)

Para a nsP4-CHIKV, por apresentar um perfil helicoidal com as bandas negativas características, foi realizado o monitoramento da transição fixando o comprimento de onda em 222 nm. Os resultados mostraram que o processo de desnaturação térmica ocorreu de forma cooperativa, com a observação da transição dos estados enovelado para desenovelado de forma definida (**Figura 6**).

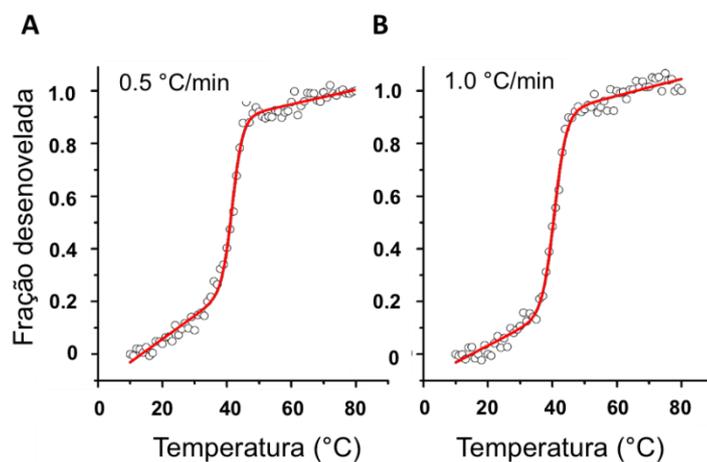


Figura 6 - Estabilidade térmica da nsP4 CHIKV obtida por CD. A elipticidade em 222 nm em função da temperatura foi transformada para a fração de proteína desenovelada. **A)** Taxa de aquecimento de 0,5 °C/min. **B)** Taxa de aquecimento de 1,0 °C/min. As linhas sólidas representam o ajuste aos dados de CD utilizando um modelo de equilíbrio de dois estados.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir deste resultado, os parâmetros termodinâmicos relacionados ao desenovelamento da nsP4-CHIKV foram obtidos através do ajuste dos dados de CD a um modelo de equilíbrio de dois estados, referente aos estados enovelado e desenovelado. Não foram consideradas as mudanças na capacidade térmica e o ajuste foi feito levando em consideração as mudanças lineares nas elipticidades pré e pós transição, em função da variação da temperatura (105). Dessa forma, foi possível obter a T_m e a variação de entalpia aparente (ΔH_{app}) para a mesma concentração proteína em duas diferentes taxas de aquecimento (**Tabela 3**). A variação da entropia aparente da transição de desenovelamento em cada T_m obtida foi calculada como sendo $\Delta S_{app} = \Delta H_{app} / T_m$, considerando $\Delta G = 0$ para cada T_m .

Tabela 3 - Parâmetros termodinâmicos de desenovelamento da nsP4 CHIKV obtidos por CD. A temperatura de *melting* (T_m) e a variação de entalpia aparente (ΔH_{app}) para 2,0 μM de proteína em duas taxas de aquecimento foram determinadas através do ajuste dos dados de CD a um modelo de equilíbrio de dois estados. A variação de entropia aparente (ΔS_{app}) foi calculada como $\Delta S_{app} = \Delta H_{app} / T_m$, considerando $\Delta G = 0$ para cada T_m .

Taxa de aquecimento (°C/min)	T_m (°C)	ΔH_{app} (kcal/mol)	ΔS_{app} (cal/mol.K)
0,5	$41,8 \pm 0,2$	122 ± 12	387 ± 38
1,0	$43,7 \pm 0,2$	104 ± 8	331 ± 26

Fonte: Elaborada pela autora.

De forma geral, com variação da taxa de aquecimento das amostras durante o experimento, foi observada uma variação na T_m da nsP4-CHIKV, bem como nos demais

parâmetros termodinâmicos. Essa dependência destes parâmetros termodinâmicos com a taxa de aquecimento foi confirmada através da técnica de DSC, que será apresentada e discutida na próxima seção (5.4.3). Em relação aos valores de variação de entalpia e variação de entropia aparente, ambos estão de acordo aos valores observados para proteínas globulares. (106)

Além do efeito causado pelo aumento da temperatura, a adição de ligantes, agentes desnaturantes ou agentes estabilizantes também podem causar mudanças nos espectros de CD característicos das proteínas. Por essa razão, a técnica CD também pode ser utilizada para estudar o efeito destas substâncias no enovelamento de proteínas e também na determinação de constantes de ligação. (107) Agentes desnaturantes comumente utilizados são a ureia e o hidrocloreto de guanidina (Gn-HCl), que ao serem titulados na solução proteica, geram uma desestabilização estrutural e conseqüentemente diminuição na elipticidade. Através destas alterações, é possível obter um estado de transição do enovelado (nativo) para o desenovelado (desnaturado), possibilitando informações sobre a estabilidade química da proteína e o cálculo da energia livre de enovelamento (ΔG). (107)

Para a observação do comportamento de desenovelamento nsP4-CHIKV frente a presença desses agentes caotrópicos, foi feita uma titulação com ureia. Na **Figura 7** é possível observar que a proteína já apresenta perturbações estruturais nas concentrações iniciais adicionadas e que a transição para o estado desenovelado não ocorre de forma cooperativa até o fim da titulação.

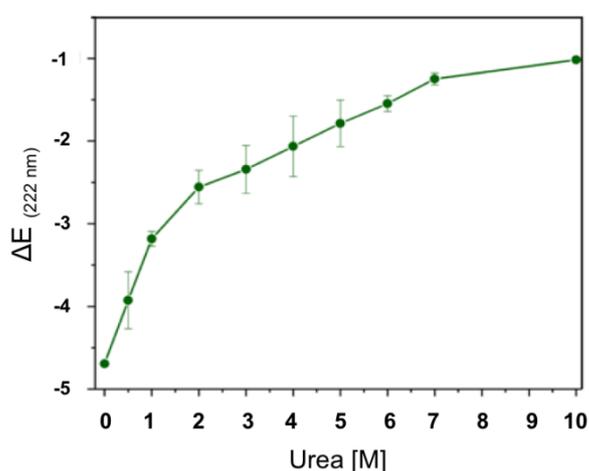


Figura 7 - Perfil de desnaturação química da nsP4 CHIKV. As alterações na elipticidade foram monitoradas em 222nm, a temperatura constante e avaliadas em função da concentração de uréia.

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando o perfil de desenovelamento apresentado pela nsP4-CHIKV nas duas condições avaliadas (temperatura e adição de ureia), é possível observar que a proteína

apresentou perfis diferentes em cada situação, sendo na desnaturação térmica um processo cooperativo, enquanto na desnaturação química demonstrou um perfil não cooperativo.

Em relação a ocorrência desse tipo de diferença nesses processos, Narayan e colaboradores, reportaram as diferenças de preferências conformacionais em estados de desnaturação térmicos e químicos de algumas proteínas. (108) Um exemplo disso, é a proteína PurR, que é um repressor de transcrição bacteriana, cuja função é a participação na regulação da biossíntese de purinas. De forma similar à nsP4-CHIKV, a desnaturação térmica da PurR apresentou-se como um processo cooperativo, enquanto a desnaturação química predominou a ausência de cooperatividade ao longo do processo. (108) Essas diferenças apresentadas podem ter várias explicações, como erros na medição das concentrações, efeitos dos aminoácidos aromáticos e pode também ser explicada por efeitos intrínsecos gerados na proteína, decorrentes da interação com os desnaturantes químicos como a ureia. (108–111)

Um outro exemplo dessas diferenças de perfis de desnaturação foi observado em um estudo de mudanças estruturais induzidas por temperatura e titulação de ureia, realizados com a enzima T7 RNA polimerase (T7RNAP) do vírus bacteriófago T7. (112) Assim como observado para a nsP4-CHIKV, para a T7RNAP o processo de desnaturação frente ao calor segue um modelo de desenovelamento cooperativo. Já para a desnaturação induzida por ureia, a T7RNAP apresentou um perfil de desenovelamento que não segue uma maneira cooperativa, composto por dois estágios sutis, sendo o primeiro no intervalo entre 2,0 e 5,0 M e o segundo estágio em concentrações superiores a 6,0 M de ureia. A formação do primeiro estágio foi associada a uma perturbação da estrutura terciária, gerando um estado desnaturado intermediário, condição essa confirmada através da observação de mudanças na elipticidade na região de 290 nm, que reflete a perda de estrutura terciária na proteína. Já no segundo estágio observado nas concentrações mais altas de ureia, corresponde ao rompimento da estrutura secundária deste intermediário, levando ao seu completo estado desenovelado. (112)

Considerando a semelhança na curva de desnaturação química da nsP4-CHIKV com a curva da T7RNAP, é possível sugerir que a desnaturação dessas polimerases virais ocorra por mecanismos similares. Para acessar essa questão, mais concentrações intermediárias de ureia podem ser testadas e experimentos de CD no UV próximo (região de 250 a 320 nm), podem ser realizados para confirmar a ocorrência deste padrão de dois estágios.

5.4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Uma outra abordagem utilizada para a caracterização biofísica de proteínas é o DSC, que consiste em um método calorimétrico baseado na medição da capacidade térmica das amostras em função da temperatura. (113) Através deste método, é possível analisar as transições de fase ou processos induzidos por mudanças na temperatura que ocorrem nessas macromoléculas, revelando informações sobre o enovelamento proteico e estabilidade térmica. (114) O DSC é considerado um método universal para estudos de desnaturação térmica, uma vez que é capaz de medir diretamente a absorção de calor associada ao processo. (114)

Em um experimento convencional de DSC, realizado em um calorímetro, o equipamento é capaz de detectar pequenas diferenças de temperatura entre a célula da amostra (solução de proteína) e a célula de referência (apenas o tampão no qual a proteína está). A medida que a temperatura nas duas células aumenta, os processos termicamente induzidos ocorrem na célula da amostra, resultando em absorção de calor e isso produz mudanças na diferença de temperatura em relação a célula de referência. (113)

De forma geral, um único pico de absorção térmica é observado no termograma, ou no caso de proteínas multidomínios, podem apresentar mais picos de absorção. Assim, é feita uma correção instrumental dos dados através da subtração da linha de base e a normalização através da concentração da solução e a integração do pico, fornecendo as medidas calorimétricas diretas da entalpia do processo (ΔH_{cal}) e também de T_m . (114)

As análises de DSC da nsP4-CHIKV foram realizadas em diferentes concentrações da proteína e utilizando diferentes taxas de aquecimento. Na **Figura 8A**, está apresentado o perfil de capacidade térmica (C_p) dependente da temperatura da nsP4-CHIKV, juntamente com a linha de base do tampão, ambos obtidos com uma taxa de aquecimento de 10 °C/h. O termograma desta proteína compreende três eventos: o primeiro é a linha de base pré transição, que corresponde a capacidade térmica do estado nativo (C_{pN}); o segundo é a transição de desenovelamento endotérmica, com o T_m aproximadamente no valor máximo da curva de C_p ; e o terceiro evento é a linha de base pós transição, representando a C_p do estado desenovelado (C_{pD}).

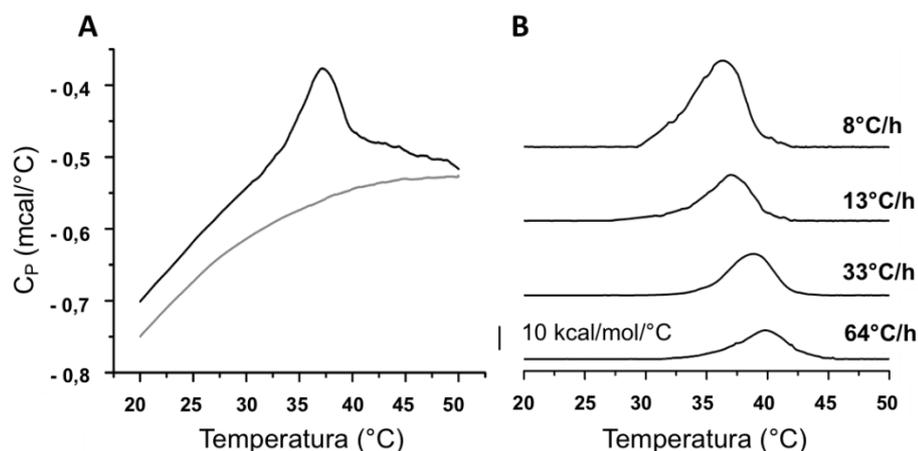


Figura 8 - **A)** Dados de DSC da desnaturação térmica irreversível da nsP4 CHIKV (concentração de 12 μ M) e a linha de base correspondente do tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 5% glicerol), obtidos usando uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}$ C/h. **B)** Capacidade térmica excedente da nsP4-CHIKV nas quatro taxas de aquecimento, como indicado, obtidas após a normalização pela concentração da proteína e subtração da linha de base do tampão.

Fonte: Elaborada pela autora.

As diferentes taxas de aquecimento foram utilizadas para avaliar o efeito causado no perfil de capacidade térmica da nsP4-CHIKV e também a reversibilidade das transições (**Figura 8B**). Primeiramente, é importante ressaltar que a proteína sofre uma desnaturação térmica irreversível, uma vez que a segunda varredura de aquecimento obtida para todas as taxas de aquecimento utilizadas não apresentou nenhum sinal (resultados não mostrados). Adicionalmente, pode-se observar que o pico de transição, T_m , aumenta com a variação da taxa de aquecimento da amostra. Esse tipo de perfil sugere a ocorrência de um processo de desenovelamento controlado cineticamente (115-116). De fato, os parâmetros termodinâmicos associados a desnaturação térmica da nsP4-CHIKV exibem essa dependência com a taxa de aquecimento (**Tabela 4**), como sugerido nas análises de CD apresentadas anteriormente.

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos associados a desnaturação térmica da nsP4 CHIKV por DSC. T. A. corresponde a taxa de aquecimento. A temperatura de desenovelamento ou de *melting*, T_m , representa a temperatura onde a curva de excesso de capacidade térmica atinge o valor máximo. A variação de entalpia calorimétrica, ΔH_{cal} , foi calculada como a área sob a curva de DSC. O $\Delta T_{1/2}$ corresponde a largura da metade da altura do pico de transição. A variação de entalpia da transição de desenovelamento a uma dada T_m , ΔS , foi calculada como $\Delta S = \Delta H_{cal}/T_m$. A variação da entalpia de van't Hoff, ΔH_{vH} , foi calculada como sendo $4RT_m^2 C_{p,max}/\Delta H_{cal}$. Incertezas: T_m ($\pm 0,2$ °C), ΔH_{cal} ($\pm 1-3$ kcal/mol), $\Delta T_{1/2}$ ($\pm 0,2$ °C). As análises dos termogramas foram realizadas utilizando o *software* MicroCal Origin.

Concentração (μM)	T.A. (°C/h)	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔS (cal/mol)	ΔH_{vH} (kcal/mol)	$\Delta H_{vH} / \Delta H_{cal}$
9,3	8	36,3	205	4,8	662	142	0,69
11,9	13	37,0	102	4,4	330	151	1,48
7,4	33	38,8	86	4,3	275	165	1,92
7,4	64	39,8	66	4,5	210	150	2,28

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma possível explicação para esse comportamento cineticamente controlado da transição endotérmica da desnaturação de proteínas foi proposta por Sanchez-Ruiz e colaboradores. (116) De acordo com os autores, deslocamentos na T_m induzidos por diferentes taxas de aquecimento (v), para processos irreversíveis de dois estados, podem ser modelados de acordo com a seguinte equação (116):

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{AR}{E_a} e^{-\frac{E_a}{RT_m}}$$

onde A é o fator pré exponencial na equação de Arrhenius e R é a constante universal dos gases. A partir disso, essa dependência da T_m em relação a taxa de aquecimento foi utilizada para calcular a energia cinética de ativação, E_a , para a desnaturação térmica irreversível da nsP4-CHIKV. Assim, graficando $\ln(v/T_m^2)$ em função de $1/T_m$, a energia de ativação aparente pode ser determinada a partir da inclinação da reta. O gráfico de Arrhenius mostrando as mudanças na T_m dependentes da taxa de aquecimento está apresentado na **Figura 9**, na qual a E_a foi determinada como $110,1 \pm 4,2$ kcal/mol, similar a outras proteínas já reportadas. (117)

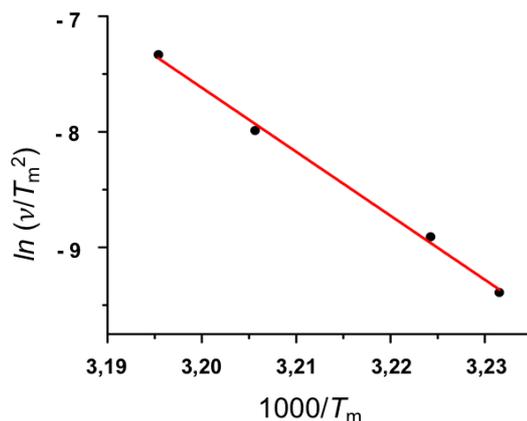


Figura 9 - Gráfico de Arrhenius mostrando a dependência da temperatura de desenovelamento (T_m) da nsP4 CHIKV com a taxa de aquecimento. A inclinação da reta corresponde a energia de ativação para o processo de desnaturação irreversível da nsP4 CHIKV.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.5 Ensaios de interação com compostos

5.5.1 Triagem de compostos por DSF

Diante da relevância da nsP4-CHIKV como alvo para a busca de novos fármacos para o tratamento da infecção por CHIKV, uma triagem inicial de compostos foi realizada através de DSF. Esta técnica possui várias aplicações no âmbito do estudo de proteínas, e neste trabalho, já havia sido utilizada nos experimentos de análise de estabilidade da nsP4-CHIKV em diferentes condições tamponantes. No que se refere a sua aplicação no descobrimento de fármacos, a técnica de DSF vem sendo amplamente utilizada nas fases iniciais da identificação de novas moléculas, pois consiste um experimento rápido, acessível, que requer pouca quantidade de amostra e que possibilita a triagem de uma grande quantidade de compostos. (14)

De forma geral, o parâmetro de deslocamento da T_m (ΔT_m) é monitorado como um indicador primário de alterações da estabilidade da proteína alvo e que, na presença do ligante em solução, sugere a ocorrência de interação entre eles. (66,118) Quando o DSF é utilizado unicamente para análise de estabilidade, consideram-se favoráveis apenas as condições que geram deslocamentos positivos, entretanto, é importante ressaltar que para as análises de interação com ligantes, são considerados deslocamentos positivos e também negativos. (14) A razão disso, é que os ligantes podem interagir com a proteína alvo tanto no seu estado nativo quanto desenovelado, o que significa que esses deslocamentos negativos não excluem interação e devem ser levados em consideração para análises adicionais. (14)

Para a nsP4-CHIKV, a triagem inicial foi realizada com uma série de 12 compostos, provenientes do projeto OpenZika. (119-120) O Openzika é um projeto científico colaborativo global, através da rede World Community Grid computational, que permitiu campanhas de triagens virtuais massivas baseadas em dockings, para as proteínas do ZIKV (por exemplo, protease NS2B-NS3, helicase NS3, polimerase NS5, proteínas de envelope e capsídeo), bem como proteínas de outros flavivírus (DENV, YFV, WNV), utilizando o banco de dados ZINC que possui aproximadamente 36 milhões de compostos. (119,121) A partir deste projeto, foram selecionados 12 compostos que foram priorizados para as polimerases de outros vírus como ZIKV e DENV e então foram testados aqui nesta triagem inicial para a nsP4-CHIKV.

A T_m da proteína na ausência de compostos (somente DMSO) foi de 37.7 ± 0.4 e as T_m obtidas para a proteína na presença dos compostos foi subtraída deste valor, gerando o ΔT_m . Dentre os compostos da série, o LabMol-309 (**Figura 10**) causou o maior deslocamento, que correspondeu a uma variação de aproximadamente 4°C . Com isso, esse dado sugere a ocorrência de interação da nsP4-CHIKV com o LabMol-309, sendo este composto escolhido para proceder com os demais ensaios.

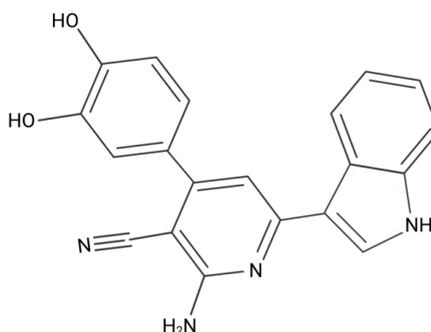


Figura 10 - Estrutura química do composto LabMol-309, identificado nos experimentos de DSF.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar das vantagens da técnica de DSF na triagem de ligantes, é importante ressaltar que uma das desvantagens deste método é a alta ocorrência de resultados falso positivos. Portanto, para contornar esta limitação e confirmar a veracidade das interações, é indispensável que os ligantes identificados sejam avaliados através de métodos ortogonais. (14) Portanto, nas seções seguintes serão apresentados os ensaios de MST e CSP, que foram utilizados para uma avaliação mais completa e confirmatória da interação da nsp4-CHIKV com o LabMol-309.

5.5.2 Avaliação da interação por MST

A Termoforese em Microescala (MST) é um método biofísico utilizado para analisar a ocorrência de interações entre biomoléculas em solução e vem sendo amplamente utilizado no estudo de interações entre proteínas e ligantes, como ferramenta no descobrimento de novos fármacos. (122-123)

Este método baseia-se no fenômeno de termoforese, também conhecido como efeito Ludwig-Soret, que é definido como a movimentação direta de moléculas através de um gradiente de temperatura. (124) As propriedades termofóricas de uma molécula, como exemplo uma proteína, são determinadas através da carga, tamanho e camada de hidratação, fazendo com que a proteína tenha um determinado padrão de movimentação termofórica. Assim, quando são adicionados pequenos ligantes, peptídeos ou outras proteínas, ocorre uma alteração nessas propriedades e conseqüentemente no padrão de migração do complexo formado, permitindo assim a detecção destas interações. (122,125) A realização do ensaio de MST com a titulação dos ligantes detectados permite a determinação da constante de dissociação aparente (K_D), fornecendo informações a nível quantitativo destas interações (122).

Sendo assim, este experimento foi realizado para confirmar a possível interação da nsP4-CHIKV com o composto LabMol-309, previamente identificado no ensaio de DSF. Primeiramente, o ensaio de checagem de ligação (do inglês, *binding check*) foi feito com o composto em uma concentração única, a fim de identificar alterações de fluorescência que estão correlacionadas a alteração no padrão de migração termofórico. Como mostrado na **Figura 11A**, ocorreu supressão da fluorescência inicial da amostra de proteína na presença do composto, quando comparado ao controle (proteína com DMSO), o que indica ocorrência de interação na concentração avaliada.

Diante deste resultado, foi realizada a titulação do composto LabMol-309, para a obtenção da curva de afinidade e, com isso, a estimativa do K_D aparente para esta interação (**Figura 11B**). A curva de afinidade obtida apresentou um perfil com definição dos estados ligados e não ligados e o $K_D \pm \Delta K_D$ estimado para essa interação foi $6,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$. Dessa forma, esses resultados confirmam a ocorrência da interação entre a nsP4-CHIKV e o LabMol-309.

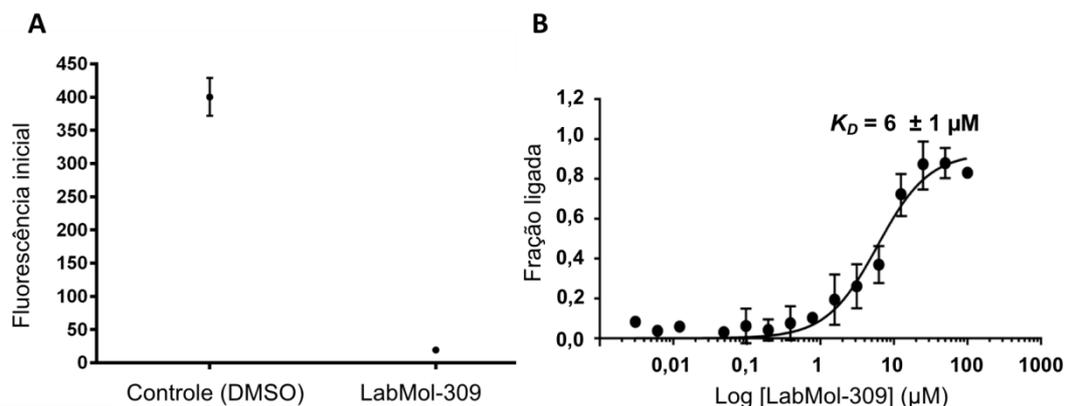


Figura 11 - A) Ensaio de checagem de ligação com o composto LabMol-309 na concentração única de 200 μM , indicando a supressão da fluorescência inicial quando comparada a amostra controle (apenas com DMSO). **B)** Curva de afinidade de ligação do LabMol-309 a nsP4-CHIKV. Constante de dissociação estimada $k_D \pm \Delta k_D = 6 \pm 1 \mu\text{M}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.5.3 Avaliação dos deslocamentos químicos por RMN

A interação da nsP4-CHIKV com o composto LabMol-309 foi também avaliada através de experimentos de ressonância magnética nuclear, monitorando as perturbações no deslocamento químico (CSP, do inglês *chemical shift perturbations*). Esta abordagem também é conhecida como mapeamento de deslocamentos químicos ou mudanças induzidas por complexação e é uma técnica experimental para o estudo de ligações a uma proteína, onde podem ser estudadas interações tanto com pequenas moléculas quanto com macromoléculas (126).

De forma geral, o experimento de CSP consiste na aquisição de espectros bidimensionais HSQC (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) do complexo que está sendo estudado e também da proteína ou ligante livres. (126) Então, a análise é feita através da medida dos deslocamentos químicos observados através das movimentações dos picos quando os espectros são sobrepostos. Os picos com maiores deslocamentos indicam as prováveis regiões de interação. (127)

Esses deslocamentos observados são bastante sensíveis a mudanças estruturais, podendo ser medidos com acurácia e assim sendo um indicativo de ocorrência de ligação. De forma contrária, se o ligante não interage, esses deslocamentos não são observados (127). Por essa razão, o CSP vem sendo utilizado como uma ferramenta no descobrimento de fármacos, uma vez que outras técnicas, como espectrofotometria, calorimetria ou ensaio enzimático, são propensas a fornecer resultados falsos positivos, enquanto o CSP em geral não (127-128).

Para os experimentos de interação com a nsP4-CHIKV, inicialmente foi necessário realizar o assinalamento do composto LabMol-309 para identificar os prótons presentes na molécula e correlacionar com as regiões específicas do espectro, como mostrado na **Figura 12**.

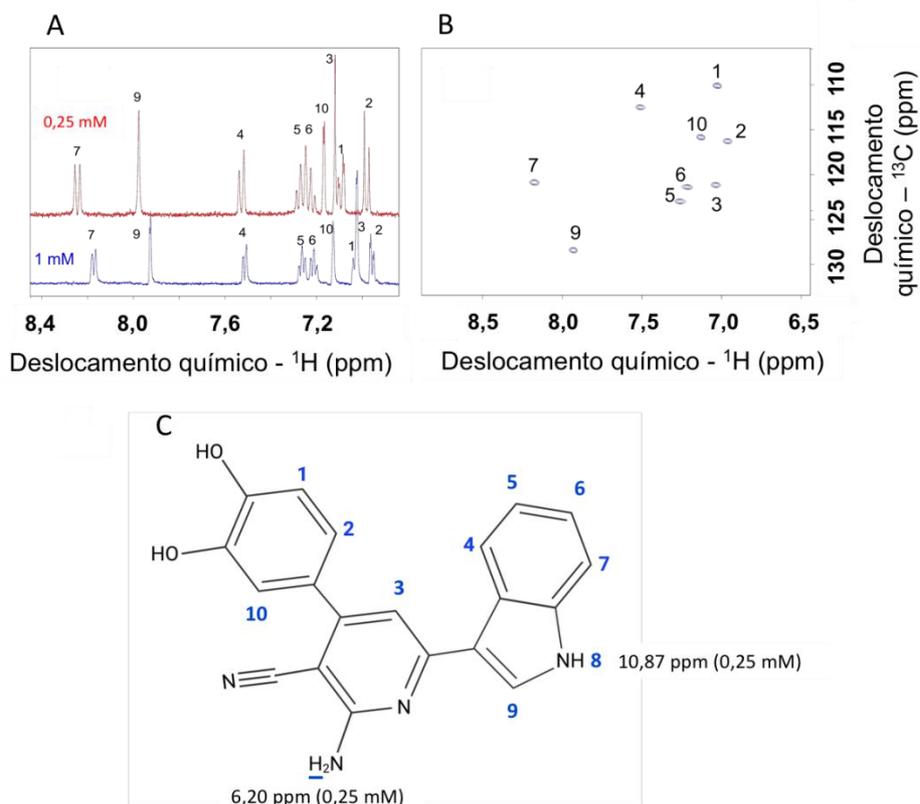


Figura 12 - Assinalamento do composto LabMol-309. (A) e (B) representam os espectros de RMN do LabMol-309 e as suas respectivas posições de ressonância dos prótons. Os espectros ¹H-¹³C-HSQS, COSY e TOCSY foram obtidos a 298 K, utilizando o compostos nas concentrações de 0,25 mM (linha vermelha) e 1 mM (linha azul) em D₂O. C) Estrutura do LabMol-309 e os respectivos posicionamentos dos prótons.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir disso, foram coletados os espectros para o ligante LabMol-309 livre e em seguida o ligante com a proteína. É importante ressaltar que as duas amostras foram preparadas no mesmo tampão, garantindo o mesmo pH e concentração iônica e também as concentrações de DMSO utilizadas para a prévia solubilização do composto foram mantidas constantes para as amostras. Esse cuidado com a padronização experimental é de extrema importância para os resultados, uma vez que diferenças entre as condições das amostras avaliadas pode gerar deslocamentos químicos não relacionados a interação. (127) Na **Figura 13**, está representada a sobreposição entre os espectros obtidos para o composto LabMol-309 na presença (linha vermelha) e na ausência (linha azul) da proteína. Assim, foi possível observar a ocorrência dos deslocamentos químicos e estes foram mapeados e medidos de

acordo com as suas respectivas posições de ressonância dos prótons do LabMol-309 que haviam sido previamente identificados no assinalamento (**Tabela 5**).

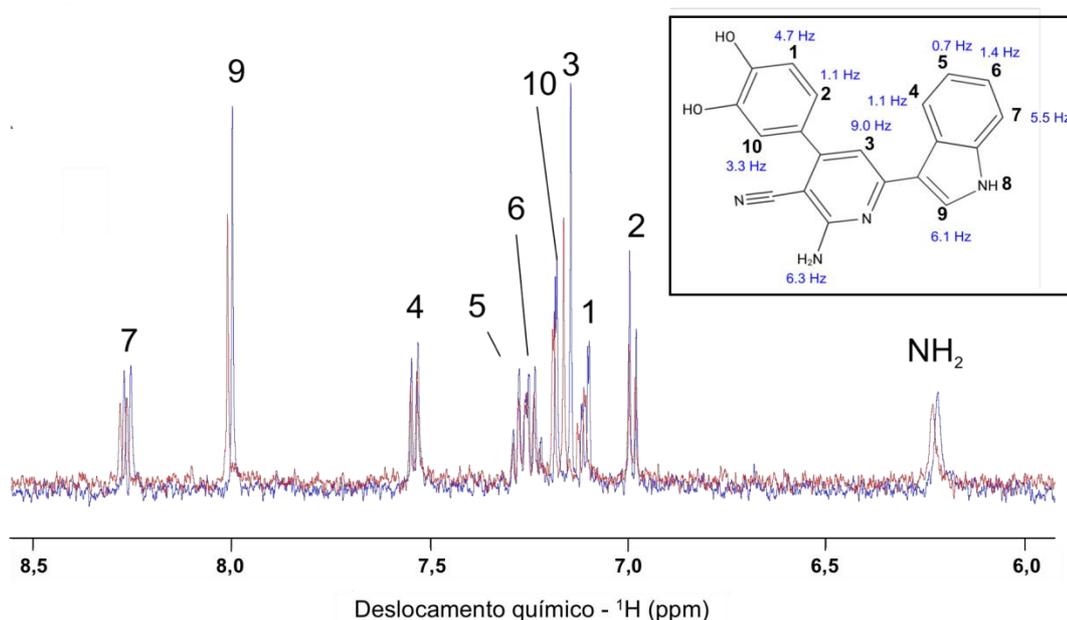


Figura 13 - Análise de CSP baseada na sobreposição dos espectros do composto LabMol-309 obtidos na presença (linha vermelha) e ausência (linha azul) da proteína nsP4-CHIKV. A direita, as diferenças nos deslocamentos químicos foram medidas (em Hz) para cada próton da estrutura do LabMol-309.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 - Deslocamentos químicos medidos para cada os prótons assinalados na estrutura do composto LabMol-309. Os deslocamentos em Hz foram medidos através das distâncias entre os picos na sobreposição dos espectros.

Localização do próton	Deslocamento químico (Hz)
1	4,7
2	1,1
3	9,0
4	1,1
5	0,7
6	1,4
7	5,5
9	6,1
10	3,3
NH2	6,3

Fonte: Elaborada pela autora

Sendo assim, a detecção destes deslocamentos químicos aqui apresentada consiste em uma evidência adicional da interação entre nsP4-CHIKV e o composto LabMol-309, confirmando e reforçando os resultados obtidos por meio de experimentos de DSF e MST.

5.6 Modelo tridimensional da nsP4-CHIKV e análise estrutural

Até o momento, a estrutura tridimensional da nsP4-CHIKV ainda não foi resolvida através de métodos experimentais e depositada em banco de dados. Sendo assim, para uma maior compreensão desta proteína a nível estrutural e também propor mais informações acerca de seu modelo de ligação com o composto LabMol-309, o modelo tridimensional da nsP4-CHIKV foi gerado utilizando abordagem computacional através do programa AlphaFold2. (63)

O AlphaFold2, lançado no final de 2020 representa um avanço revolucionário na área da biologia estrutural e computacional pois possibilita a predição de estruturas de proteínas com elevada acurácia, mesmo na ausência de estruturas similares conhecidas. (63) O método implementado no AlphaFold2 baseia-se em um algoritmo de aprendizagem de máquina profundo (*deep learning*), que incorpora conhecimentos físicos e biológicos sobre estruturas de proteínas através de alinhamentos multisequenciais. Os modelos gerados pelo AlphaFold2 apresentaram resultados competitivos comparados com estruturas resolvidas experimentalmente e a performance do programa foi considerada superior a outros métodos existentes. (63)

O modelo obtido para a nsP4-CHIKV está apresentado na **Figura 14**. Para a avaliação da qualidade deste modelo, foi utilizada uma medida de confiança local por resíduo, denominada pLDDT (do inglês, *per-residue confidence score*). Esta medida é baseada no Teste de Diferença de Distância Local (IDDT, do inglês *Local Distance Difference Test*), que é uma medida de sobreposição que avalia as diferenças de distâncias locais para todos os átomos de um modelo, incluindo a validação estereoquímica e utiliza como referência conjuntos de estruturas equivalentes. (129) Assim, o pLDDT apresenta-se como uma escala de 0 a 100, na qual os valores podem variar drasticamente ao longo da cadeia, sendo maiores para domínios estruturados e menores valores para regiões possivelmente desordenadas. (130) Regiões com pLDDT < 50 não devem ser interpretadas, exceto como uma possível predição de desordem. A pLDDT do modelo da nsP4-CHIKV foi superior a 90 para a maioria das regiões da proteína e somente para as regiões N-terminal e C-terminal que o valor do pLDDT foi baixo (pLDDT < 50) (**Figura 14A**).

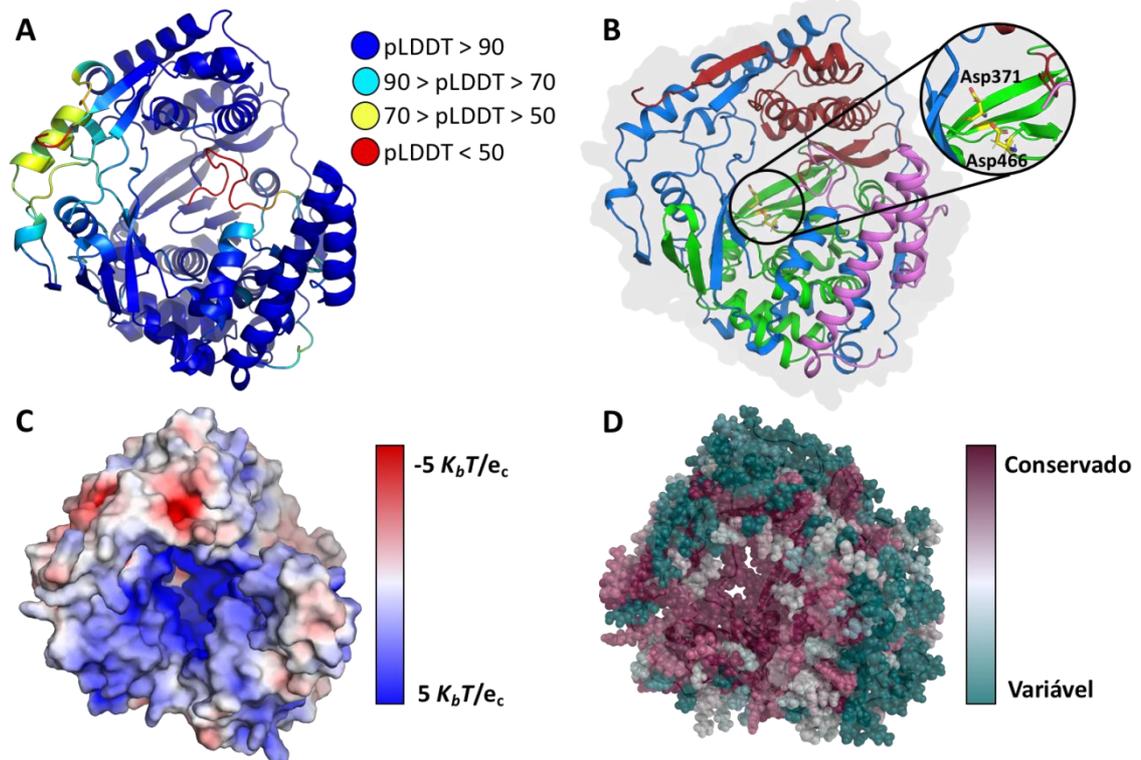


Figura 14 - Modelo tridimensional da nsP4-CHIKV obtido pelo AlphaFold2. **A)** Modelo colorido de acordo com o pLDDT, onde as escalas de cores estão representadas na parte superior direita. **B)** Modelo da nsP4-CHIKV colorido de acordo com o assinalamento de domínios. As hélices da região N-terminal, dedos, domínio catalítico e polegar estão coloridos em roxo, azul, verde e vermelho, respectivamente. Na inserção, é apresentada uma visão detalhada do resíduos de ácido aspártico catalíticos. **C)** Projeção do potencial eletrostático na superfície da nsP4-CHIKV, calculado através do método APBS. As regiões positivas estão representadas em azul e as regiões negativas em vermelho. **D)** Análise do modelo da nsP4-CHIKV utilizando o ConSurf, na qual os aminoácidos são coloridos de acordo com o grau de conservação das regiões. Na barra de cores, o sentido em direção a cor verde indica maior variabilidade e o sentido em direção a cor roxa indica maior conservação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação as regiões da estrutura da nsP4-CHIKV, foram identificadas as regiões correspondentes aos domínios característicos das polimerases virais, que são os domínios “dedos” (resíduos 93-315), “palma” (resíduos 316 a 502) e “polegar” (resíduos 503-611) (**Figura 14B**). No sítio catalítico, localizado no domínio “palma”, também foram identificados os resíduos de ácido aspártico que foram a díade catalítica (Asp 371 e Asp 466), separados por uma distância de 7,5 Å. Adicionalmente, o modelo da nsP4-CHIKV contém um domínio N-terminal extra (resíduos 1-92) formando uma estrutura em *coiled coil*. Um motivo semelhante a este foi observado na região N-terminal da proteína nsp8 do complexo RdRp do vírus SARS-CoV-2, e provavelmente é responsável pelo posicionamento adequado da fita nascente de RNA durante a polimerização. (131)

O potencial eletrostático de superfície foi calculado através do método APBS e revelou a notável predominância de cargas positivas na região da cavidade do sítio ativo (**Figura 14C**), o que é uma característica comumente encontrada para motivos que interagem com ácidos nucleicos. (132) Por fim, a análise de regiões conservadas utilizando o programa ConSurf revelou que a região do sítio catalítico e seus arredores são altamente conservados (**Figura 14D**).

Sendo assim, esses resultados em conjunto corroboram para a robustez do modelo da nsP4-CHIKV obtido através do AlphaFold2, sendo este modelo utilizado nas análises computacionais com o composto LabMol-309 que serão descritas a seguir.

5.7 Docking molecular e dinâmica molecular do complexo nsP4-CHIKV-LabMol-309

A investigação do possível modo de ligação do composto LabMol-309 na nsP4-CHIKV foi realizada através de cálculos de *docking* molecular (24) e que foram realizados em colaboração com a Dra. Melina Mottin (Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Brasil). Este método é comumente utilizado nos estudos de descobrimento de fármacos e é capaz de prever a conformação de pequenas moléculas ligantes dentro de um sítio de ligação alvo, identificando os posicionamentos mais favoráveis e computando as possíveis interações existentes no complexo formado. (24,133)

Para o complexo nsP4-CHIKV-LabMol-309, os cálculos de *docking* foram realizados utilizando o servidor DockThor, centralizando na região do sítio ativo. Os resultados sugeriram que o LabMol-309 se liga ao sítio ativo da nsP4-CHIKV, interagindo com resíduos da região GDD (Asp466 e Asp467), com um escore de energia de -7,15 Kcal/mol-1. Adicionalmente, o LabMol-309 realiza ligações de hidrogênio com os resíduos Glu369, Asp466, Asp467, Gly507, Arg573 e interações de cátion- π com o resíduo Lys295 (**Figura 15**). O átomo de nitrogênio do grupo indól e a amina do grupo piridina do composto fazem interações relevantes com Asp466 e Asp467, respectivamente. Além disso, o grupo indól também realiza interação cátion- π com Lys295.

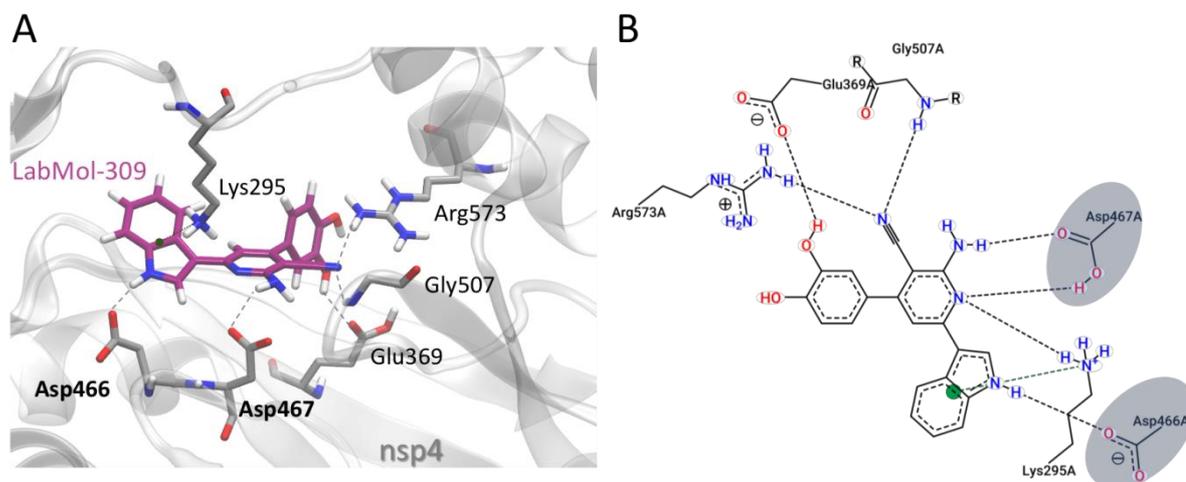


Figura 15 - Modelo de interação entre a nsP4-CHIKVA e o LabMol-309, obtido através dos cálculos de docking. **A)** Representação em 3D das interações entre os resíduos da nsP4-CHIKV e o LabMol-309. As ligações de hidrogênio estão representadas pelas linhas pontilhadas na cor cinza e as interações cátion- π pela linha pontilhada verde. Os átomos de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio estão mostrados em vermelho, azul e branco, respectivamente. Os átomos de carbono do LabMol-309 estão representados em rosa e os dos resíduos proteína estão em cinza. Os resíduos catalíticos da região GDD estão destacados em negrito. **B)** Diagrama de interação 2D do LabMol-309 com a nsP4-CHIKV. As ligações de hidrogênio estão representadas pelas linhas pontilhadas na cor cinza e as interações cátion- π pela linha pontilhada verde. Os resíduos catalíticos da região GDD estão destacados em azul.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar dos resultados de *docking* fornecerem informações consistentes sobre o possível modo de interação e os principais resíduos envolvidos, é importante ressaltar que este método fornece estas informações a partir de um modelo estático. Portanto, a utilização das simulações de dinâmica molecular surge como uma ferramenta importante para complementar as informações obtidas no *docking*, permitindo uma validação desses modelos obtidos. (134-135) Com isso, é possível observar se ocorre a permanência do ligante no sítio durante o tempo de simulação, a manutenção das interações previamente propostas no *docking*. (136)

Sendo assim, o complexo nsP4-CHIKV-LabMol-309 foi avaliado através de simulações de dinâmica molecular e que foram realizadas em colaboração com o Dr. Ícaro Putinhon Caruso (Universidade Estadual Paulista – UNESP-IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brasil). O desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *root mean square deviation*) foi um dos parâmetros considerados para avaliar a estabilidade estrutural do complexo. A **Figura 16A** apresenta os valores de RMSD para os átomos da cadeia principal da proteína e os átomos (com exceção dos hidrogênios) do ligante, a partir da estrutura inicial do complexo que foi obtida nos cálculos de *docking*. Assim, é possível observar que os valores de RMSD são estáveis após 5 ns de simulação e atingem platôs em torno de 0,3 e 0,5 nm para a proteína e o ligante, respectivamente.

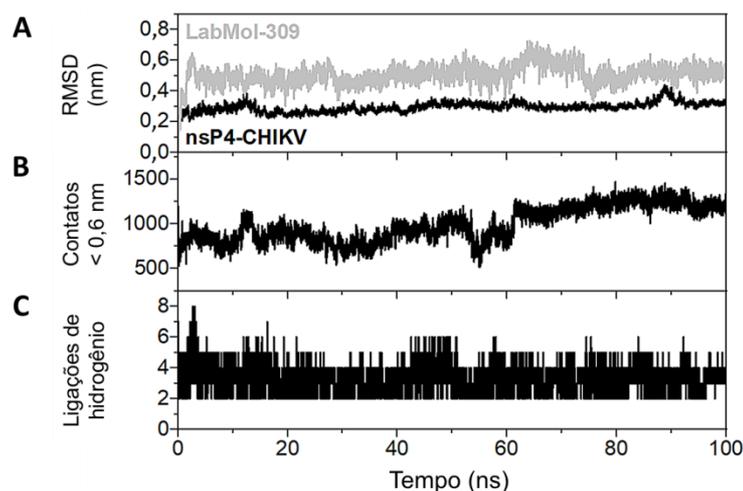


Figura 16 - Avaliação da estabilidade estrutural através de simulações de dinâmica molecular do modelo do complexo nsP4-CHIKV-LabMol-309. **A)** Análise de RMSD para os átomos da cadeia principal da proteína (linha preta) e os átomos (não hidrogênios) do composto (linha cinza). **B)** Número de contatos entre os átomos da nsP4-CHIKV e do LabMol-309 a distâncias inferiores a 0,6 nm. **C)** Número de ligações de hidrogênio formadas entre a proteína e o composto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação a manutenção das interações, a **Figura 16B** mostra que o número de contatos < 0,6 nm entre nsP4-CHIKV e LabMol-309 não cai para zero ao longo da simulação, indicando que o ligante interage com a proteína durante todo o tempo avaliado. O número de ligações de hidrogênio é estável ao longo das simulações e apresenta um valor médio de três ligações (**Figura 16C**). Uma avaliação das ligações de hidrogênio com significativo percentual de ocupância (< 5%, **Tabela 6**) durante a trajetória, revela que Glu369, Asp371, Asp466, Asp467, Asn468, Lys501 e Arg573 são importantes para a estabilização do complexo proteína-ligante. Vale destacar que o Glu369 e o Asp371 apresentaram percentuais de ocupação superiores a 70%.

Tabela 6 - Percentuais de ocupação das ligações de hidrogênio formadas entre a nsP4-CHIKV e o LabMol-309, através de simulações de dinâmica molecular de 100 ns. Em negrito, os percentuais significativos de ocupação das ligações de hidrogênio (superiores a 5%).

Doadores		Aceptores		Percentual de ocupação (%)
Resíduo	átomo	Resíduo	átomo	
LYS295	NZ	LABMOL-309	N2	0.010
LYS295	NZ	LABMOL-309	N3	0.030
ASN468	N	LABMOL-309	N4	0.020
LYS492	NZ	LABMOL-309	O1	0.160
LYS492	NZ	LABMOL-309	O2	0.020
LYS501	NZ	LABMOL-309	O1	1.070
LYS501	NZ	LABMOL-309	O2	19.158
TYR504	OH	LABMOL-309	N1	0.080
GLY507	N	LABMOL-309	N1	0.010
LYS527	NZ	LABMOL-309	N1	0.010
LYS527	NZ	LABMOL-309	N2	0.500
LYS527	NZ	LABMOL-309	N3	1.020
ARG573	NE	LABMOL-309	N1	1.380
ARG573	NH1	LABMOL-309	O1	0.030
ARG573	NH1	LABMOL-309	O2	3.620
ARG573	NH1	LABMOL-309	N1	5.659
ARG573	NH1	LABMOL-309	N2	0.180
ARG573	NH2	LABMOL-309	O1	0.040
ARG573	NH2	LABMOL-309	O2	7.219
ARG573	NH2	LABMOL-309	N1	7.019
ARG573	NH2	LABMOL-309	N2	0.330
ARG573	NH2	LABMOL-309	N3	0.010
TYR574	OH	LABMOL-309	N1	0.080
LABMOL-309	O1	ASP371	OD1	11.049
LABMOL-309	O1	ASP371	OD2	88.341
LABMOL-309	O2	GLU369	OE1	73.973
LABMOL-309	O2	GLU369	OE2	27.697
LABMOL-309	N2	ASP467	OD2	0.010
LABMOL-309	N2	TYR504	OH	0.200
LABMOL-309	N2	TYR574	OH	0.890
LABMOL-309	N4	THR370	OG1	0.030
LABMOL-309	N4	ASP466	OD1	1.120
LABMOL-309	N4	ASP466	OD2	0.460
LABMOL-309	N4	ASP466	O	5.489
LABMOL-309	N4	ASP467	OD1	43.086
LABMOL-309	N4	ASP467	OD2	15.968
LABMOL-309	N4	ASN468	OD1	9.699
LABMOL-309	N4	ASN468	ND2	0.020
LABMOL-309	N4	ASN468	O	0.010

Fonte: Elaborada pela autora.

Compilando as análises de dinâmica molecular aqui apresentadas, pode-se concluir que o modelo estrutural do complexo nsP4-CHIKV-LabMol-309 foi considerado estável ao longo da simulação.

5.8 Ensaios celulares

Os dados obtidos para o composto LabMol-309 e a nsP4-CHIKV aqui apresentados corroboram e fornecem evidências sólidas para a ocorrência da interação entre estas duas moléculas. No entanto, esses resultados ainda não sustentam uma conclusão de que de fato o composto apresenta potencial inibitório na replicação viral.

A caracterização bioquímica da atividade das polimerases dos Alfavírus representa um cenário desafiador, uma vez que estas proteínas não desempenham efetivamente a sua função isoladamente, o que dificulta o estudo da sua atividade a partir de uma proteína purificada. (61) Diferentes regiões da nsP4-CHIKV reconhecem os promotores para as fitas negativa e positiva, porém a ligação a estes promotores requer a presença de outras proteínas não estruturais para a formação do complexo de replicação e a síntese do RNA viral. (54,61,137)

Tomar e colaboradores (2006) demonstraram que o reconhecimento do molde e a ativação da nsP4 via interações proteína-proteína, requerem a presença da poliproteína viral P123. (138) Em outro trabalho, a nsP4 de SINV foi expressa em *E.coli*, purificada e a atividade de polimerase também foi observada somente na presença da poliproteína P123. (137) Recentemente, Lello e colaboradores demonstraram que as nsP4 dos Alfavírus SINV, CHIKV, ONNV, BFV, RRV, SFV, MAYV, VEEV, e EILV isoladamente, apresentavam níveis mínimos de atividade de polimerase. (59) Utilizando um sistema de trans-replicase consistindo em dois módulos funcionais relativamente independentes (nsP4 e P123), foi demonstrado que a nsP4 destes Alfavírus citados foi ativa somente quando combinadas com as suas respectivas P123. (59) Adicionalmente, Tan e colaboradores (2022) avaliaram a atividade de polimerase das nsP4 de SINV e RRV e como resultados, as proteínas isoladas apresentaram atividade baixa, com menor eficiência que a RdRp do vírus da Dengue (DENV), utilizada como controle positivo. (62)

Dessa forma, esses achados corroboram para o fato de que a nsP4 de Alfavírus produzida isoladamente não sintetizam eficientemente o RNA, a menos que combinada com a poliproteína P123 obtida a partir de extratos celulares. (137,139-140) Apesar desta dependência já ser bem documentada na literatura, outras informações sobre as interações exatas que ocorrem entre essas proteínas dentro do complexo durante a replicação, bem como a interação com fatores do hospedeiro ainda permanecem pouco caracterizadas. (54)

Dadas essas limitações, não foi possível avaliar o efeito do LabMol-309 diretamente na atividade enzimática da nsP4-CHIKV purificada. Entretanto, diante da relevância de se obter informações da atividade antiviral de um potencial composto, essas limitações foram

contornadas com a utilização ensaios baseados em replicon e também ensaios antivirais com células infectadas com o CHIKV repórter (CHIKV-nanoluc).

Os sistemas replicon vem sendo utilizados há décadas como uma abordagem promissora no descobrimento de novos fármacos antivirais, permitindo a triagem e identificação de potenciais inibidores. (141) De forma geral, são sistemas subgenômicos auto-replicativos, nos quais os genes que codificam as proteínas estruturais do vírus são substituídos por um gene repórter, permitindo a detecção luminescente (utilização de luciferases) ou fluorescente (utilização de proteínas fluorescentes) da replicação do RNA. (142) Assim, a transfecção de células susceptíveis com o replicon resulta em uma expressão transiente da proteína repórter, cujo nível de atividade reflete a extensão da replicação viral em um dado período de tempo. Dessa forma, moléculas que causam inibição da replicação causam diminuição da expressão desta proteína repórter, permitindo a detecção deste efeito. (141)

O fato de não codificar as proteínas estruturais oferece uma vantagens a este sistema, pois não necessita de níveis de biossegurança elevados para a realização dos ensaios, uma vez que os sistemas não são infectantes. (141) Entretanto, é importante ressaltar que em sua maioria, são sistemas que permitem ensaios com moléculas que possivelmente afetam apenas a nível de replicação viral, não sendo adequados para estudos com moléculas que interferem na entrada, montagem ou liberação viral. (142)

No que se refere especificamente ao CHIKV, a utilização de células BHK-21 contendo construções de replicon de CHIKV já foram reportadas em triagens de alto rendimento de inibidores de replicação viral. (143-144) O mesmo sistema também foi utilizado para avaliar a atividade anti-CHIKV de outros compostos e diferentes flavonoides. (145–147) Sendo assim, a avaliação do composto LabMol-309 em sistema replicon de CHIKV foi realizada em colaboração com a Dra. Rafaela Sachetto Fernandes (Universidade de São Paulo – USP-IFSC, São Carlos, SP, Brasil) e os ensaios foram realizados de modo concentração-dependente para a avaliação do efeito e determinação das concentrações efetivas (EC_{50}) e citotóxicas (CC_{50}).

As células transfectadas com o replicon foram incubadas com diluições seriadas de 2 vezes o composto (de 20 a 0,03 μM para EC_{50} e de 100 a 0,30 μM para CC_{50}) e os sinais de luciferase ou a viabilidade celular foram avaliados após 48 horas. O LabMol-039 apresentou um valor de EC_{50} de $10,0 \pm 0,07 \mu\text{M}$ e demonstrou um CC_{50} de $17,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$ (**Figura 17**). A partir deste resultado, o índice de seletividade obtido (CC_{50}/EC_{50}) do LabMol-039 foi de SI= 1,7.

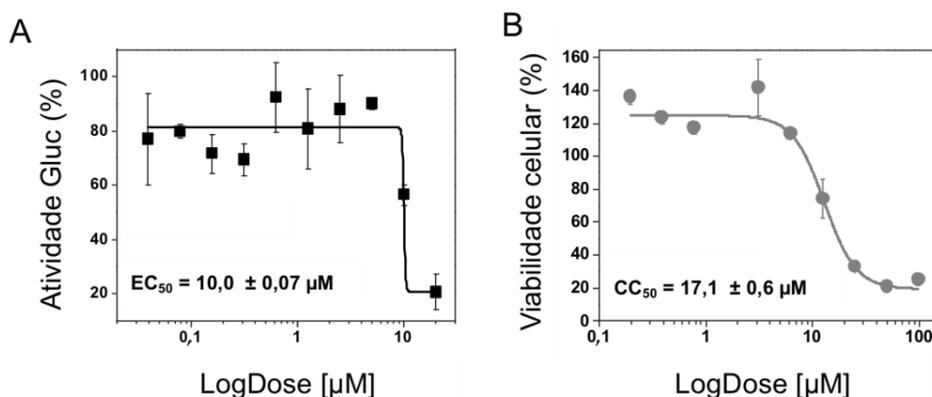


Figura 17 - Efeito do composto LabMol-309 no sistema replicon de CHIKV. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e realizados em duplicatas **A)** Curva de EC₅₀ gerada a partir da incubação das células com o composto em diluição seriada de 20 μ M a 0,03 μ M, durante 48h. A atividade *Gluc* foi medida utilizando o sobrenadante celular. **B)** Curva de CC₅₀ gerada a partir da incubação das células com o composto em diluição seriada de 100 μ M a 0,3 μ M, durante 48h. A viabilidade celular foi medida utilizando o sobrenadante celular .

Fonte: Elaborada pela autora

Em comparação com outros estudos que também utilizaram sistemas replicon de CHIKV, o valor de EC₅₀ obtido para o LabMol-309 foi menor do que os valores já reportados para outros compostos (143,146), reforçando o seu potencial como um promissor candidato para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento desta infecção. Em relação ao SI obtido, os dados sugerem que apesar da atividade observada, modificações químicas no composto são necessárias para otimizar a eficiência e reduzir a sua toxicidade.

De forma complementar, ensaios com culturas celulares infectadas com CHIKV foram conduzidas em colaboração com o grupo da Profa. Ana Carolina Gomes Jardim (Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Minas Gerais, Brasil). As células BHK-21 foram infectadas com o CHIKV-*nanoluc*, que consiste em um CHIKV recombinante expressando o repórter Nanoluciferase, em uma multiplicidade de infecção (MOI, do inglês *multiplicity of infection*) de 0,1, com diluição seriada de fator 2, variando de 0,78 a 100 μ M. Os níveis de atividade da Nanoluciferase, que são proporcionais à replicação viral, foram avaliados 16 horas após a infecção. (adaptada de (90-91))

Paralelamente, ensaios de viabilidade celular foram conduzidos para a determinação da CC₅₀ e para o controle não tratado do ensaio foi utilizado o DMSO 0,1% (**Figura 18**). Assim, os resultados demonstraram que o composto LabMol-309 apresentou EC₅₀ de 5,2 μ M em células BHK-21 infectadas com o CHIKV-*nanoluc* e um CC₅₀ de 52 μ M em células BHK *naive*, durante o período de incubação de 48 horas. Sendo assim, a relação entre o EC₅₀ e o CC₅₀ resultou em um SI de 10.

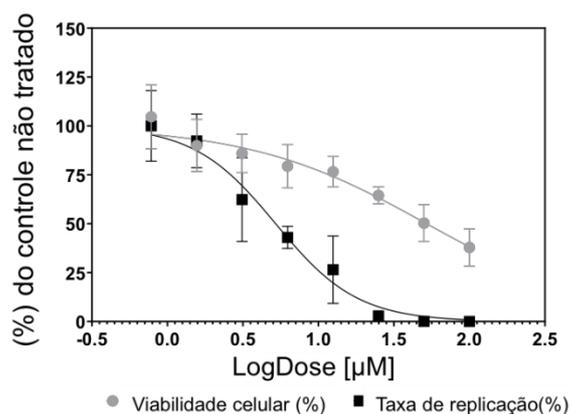


Figura 18 - Efeito do composto LabMol-309 na viabilidade de células BHK-21 e na replicação do CHIKV-*nanoluc*. As células BHK-21 foram tratadas com o LabMol-309, numa faixa de concentração de 0,78 a 100 µM, na presença ou ausência do CHIKV-*nanoluc* durante 16h. A replicação viral foi quantificada através da medição da atividade da Nanoluciferase (indicado por ●) e a viabilidade celular foi medida utilizando o ensaio de MTT (indicado por ■). Resultados representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As barras de erros representam os desvios padrão. Figuras e análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 8.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em conjunto, os resultados obtidos nos ensaios com o replicon e nos ensaios celulares antivirais, sugerem que o LabMol-309 é uma molécula potencial a ser avaliada como inibidora da replicação do CHIKV. As diferenças nos valores obtidos para células BHK-21 naive e BHK-CHIKV são aceitáveis, uma vez que diferentes fatores estão envolvidos nestes ensaios (**Tabela 7**). Como exemplo, nos ensaios antivirais, o vírus está efetivamente infectando as células e desenvolvendo todos os estágios do seu ciclo replicativo. Isso significa que o tratamento com o LabMol-309 pode estar atuando mesmo antes da formação do complexo de replicação. Alternativamente, nos sistemas replicon BHK-CHIKV, os sistemas transfectados nas células já estão formados quando o tratamento inicia o que pode impactar na efetividade da atividade antiviral em um curto período de tempo.

Tabela 7 - Efeito do composto LabMol-309 na viabilidade de células BHK-21 (CC₅₀) e na replicação do CHIKV (EC₅₀) durante 16h de tratamento.

Composto	Tipo de ensaio	CC ₅₀	EC ₅₀	Índice de Seletividade (SI)
LabMol-309	CHIKV- <i>nanoluc</i> e células BHK-21	52	5.2	10
	Replicon BHK-CHIKV	17.1	10.0	1.7

Fonte: Elaborada pela autora.

Adicionalmente, a presença do replicon pode causar alterações na resposta celular ao composto, o que explicaria a maior toxicidade apresentada nestes sistemas. Este efeito isolado predominantemente observado nas células com replicons pode ser explicado pelas diferenças nos períodos de incubação utilizados nos experimentos de atividade antiviral (48 horas para os ensaios com replicons comparado a 16 horas nos ensaios de infecção viral). A exposição prolongada das células ao composto pode resultar em uma maior toxicidade (148), o que reforça a importância de estudos adicionais de perfil farmacocinético e de toxicidade em modelos animais.

Até o momento, esta é a primeira descrição do composto LabMol-309 como um inibidor de replicação de CHIKV e o seu valor de EC50 relativamente baixo apresentou-se em níveis similares a outros inibidores de replicação de CHIKV reportados, enfatizando o potencial antiviral deste composto. (149-150) Neste contexto, os resultados obtidos para os ensaios antivirais sugerem que o LabMol-309 é uma molécula em fase inicial de descoberta e que apresentou considerável potencial para ser posteriormente otimizada, visando reduzir sua citotoxicidade e aumentar o seu índice de seletividade nestes ensaios.

6 CONCLUSÕES

Diante da ausência de tratamentos específicos para a infecção causada pelo CHIKV, faz se importante o entendimento, a nível molecular, das proteínas envolvidas no processo de replicação viral e assim, a utilização destas como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais. Neste capítulo, focado na polimerase nsP4-CHIKV, foi possível a obtenção da proteína purificada e a sua caracterização através de métodos biofísicos e computacionais, gerando informações estruturais e dinâmicas que ainda não haviam sido reportadas na literatura para polimerases de Alfavírus. A alta prevalência de estruturas secundária helicoidais foi observada através de CD, que também mostrou que a nsP4-CHIKV desenovela seguindo uma transição cooperativa durante a desnaturação térmica e uma transição não cooperativa durante a desnaturação química. O efeito da temperatura neste comportamento e nos parâmetros termodinâmicos foi complementado através de DSC, indicando um processo controlado cineticamente.

Considerando a nsP4-CHIKV como um alvo promissor, uma triagem de compostos foi realizada através de DSF, e um composto denominado LabMol-309 foi identificado. A interação entre eles foi validada através de MST e apresentou afinidade na faixa de baixo micromolar. Experimentos de RMN foram utilizados adicionalmente para avaliar a interação da nsP4-CHIKV com LabMol-309 e os resultados demonstraram a ocorrência de perturbações no deslocamento químico, confirmando a ocorrência da interação entre essas moléculas. Considerando a ausência de estrutura tridimensional da nsP4-CHIKV resolvida experimentalmente, foi gerado um modelo desta proteína através do AlphaFold2 e que foi utilizado para os cálculos de docking molecular e dinâmica molecular do complexo formado pela nsP4-CHIKV e o LabMol-309. Assim, foi sugerindo o possível modo de ligação deste composto e a sua permanência no sítio ativo foi demonstrada durante o tempo de simulação utilizado. Por fim, a atividade inibitória do LabMol-309 foi avaliada em ensaios celulares utilizando sistema replicon de CHIKV e também com vírus repórter CHIKV-*nanoluc*, demonstrando o potencial inibitório deste composto.

Em resumo, este capítulo destaca características biofísicas da nsP4-CHIKV e também a identificação de um novo composto promissor para ser otimizado como um agente antiviral para o tratamento da Febre Chikungunya. Assim, estes resultados contribuem para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos tendo como alvo a nsP4-CHIKV e trazem novas informações para o progresso da áreas de estratégias terapêuticas para CHIKV e outras infecções causadas por Alfavírus.

7 CAPÍTULO II: PROTEÍNA PL_{pro} – PAPAINE LIKE PROTEASE DO SARS-CoV-2

7.1 O vírus SARS-CoV-2: isolamento, epidemiologia e cenário atual

Em dezembro de 2019, a população mundial presenciou o surgimento do novo Coronavírus, denominado SARS-CoV-2, que foi identificado pela primeira vez na província de Wuhan, na China (6). Desde então, a sua dispersão ocorreu rapidamente, impactando a economia e os sistemas de saúde pública de todo o mundo. Isso fez com que em março de 2020, a Organização Mundial de Saúde declarasse como uma situação de pandemia. (7) A doença causada pelo SARS-CoV-2 foi denominada COVID-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*) e desde o seu surgimento até abril de 2022, foram confirmados mais de 515 milhões de casos, incluindo mais de 6 milhões de óbitos. (151)

Filogeneticamente, o SARS-CoV-2 é um betacoronavírus e pertence ao mesmo subgênero dos coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS-CoV, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus*) e da Síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*), responsáveis pelas epidemias de 2002 e 2013 respectivamente. (152) A forma exata que o SARS-CoV-2 se originou ainda não foi completamente elucidada, porém é amplamente proposto que tenha se originado de animais, ocasionando uma transmissão zoonótica. Assim, análises genômicas sugerem que este vírus tenha evoluído a partir de uma cepa encontrada em morcegos e existe a hipótese de que avançou para hospedeiros intermediários como os pangolins, até chegar aos humanos. (153)

Assim como outros vírus de RNA, a alta dispersão favorece o aparecimento de mutações e assim, o surgimento de novas variantes ao longo do tempo. De acordo com a OMS, desde o início da pandemia, uma série de variantes emergiram, apresentando diferenças em relação a cepa ancestral. (154) Dentre elas, são consideradas variantes de preocupação (VOCs, do inglês *variants of concern*) aquelas potencialmente mais transmissíveis ou virulentas, causar redução na neutralização por anticorpos obtidos através de infecção natural ou vacinação e até mesmo as variantes capazes de gerar uma diminuição na eficácia terapêutica ou vacinal. (154)

A Alfa (B.1.1.7), foi a primeira variante de preocupação descrita e isolada no Reino Unido, em Dezembro de 2020. As variantes Beta (B.1.351) e Delta (B.1.617.2) também foram identificadas em Dezembro de 2020 na África do Sul e Índia, respectivamente. Em Janeiro de 2021, variante Gama (P.1) foi identificada no Brasil. Por fim, a variante Ômicron (B.1.1.529)

foi reportada pela primeira vez na África do Sul em Novembro de 2021, após um rápido aumento do número de casos reportados. (154)

Além das variantes de preocupação, também existem as variantes de interesse (VOIs, do inglês variants of interest), que são cepas que foram identificadas com mutações e que atualmente ainda estão sob investigação dos especialistas a fim de verificar as alterações na capacidade de transmissão, resposta ao tratamento e entre outros fatores. Entre elas, estão as variantes Epsilon (B.1.427 / B.1.429, Estados Unidos), Zeta (P.2, Brasil), Theta (P.3, Filipinas), Iota (B.1.526, Estados Unidos), Kappa (B.1.617.1, Índia) e Lambda (C.37, Peru). (154) Diante deste cenário, o sequenciamento genômico periódico de amostras virais é de fundamental importância, especialmente em um contexto de pandemia, pois ajuda a detectar novas variantes genéticas do SARS-CoV-2. (155)

Desde o seu isolamento até os dias atuais, o SARS-CoV-2 já se espalhou por mais de 223 países. De acordo com dados recentes apresentados pela OMS, as variantes já foram reportadas em mais de 200 países ao redor do mundo, sendo a variante Ômicron já reportada em 76 países desde a sua primeira identificação. (156) Em relação a distribuição por países, os Estados Unidos lideram o número de casos confirmados e de mortes, seguido do Brasil e da Índia. (154,157)

Mesmo diante dos grandes impactos causados nesta pandemia, é importante ressaltar os esforços extraordinários que foram mobilizados em todo o mundo, para buscar estratégias de contenção desta situação devastadora. Isso resultou no desenvolvimento emergencial de vacinas, em uma velocidade nunca vivenciada pela comunidade científica e pela população mundial. (154) Após os resultados obtidos nos ensaios clínicos de fase III e a aprovação pelos órgãos regulatórios de cada país, as vacinações iniciaram e as doses de reforço já estão sendo realizadas. Até abril de 2022, mais de 11 milhões de doses de vacina foram administradas em todo o mundo (mais de 4 bilhões de pessoas completamente vacinadas) e no Brasil esse número ultrapassa 400 mil doses. (151)

Apesar desses avanços significativos, alcançar a cobertura de toda a população mundial ainda representa um grande desafio e o tempo para isso ocorrer permanece indeterminado. Somado a isso, o aparecimento de novas variantes faz com que os protocolos vacinais necessitem de constante revisão quanto a cobertura e eficácia. (154) Portanto, mesmo no contexto da existência das vacinas, a busca por tratamentos eficazes ainda se faz imprescindível para o manejo da epidemia, uma vez que a cobertura vacinal e a emergência de novas variantes sugerem que casos de COVID-19 ainda continuarão a acontecer.

7.2 COVID-19: aspectos gerais, diagnóstico, tratamento e profilaxia

A COVID-19, como ficou conhecida a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, é transmitida através de gotículas durante o contato próximo e desprotegido com pessoas contaminadas. (158) De forma geral, apresenta-se como uma síndrome respiratória, seguindo um padrão semelhante ao previamente observado em 2002 nas infecções por SARS-CoV. (159-160) O estágio inicial da COVID-19, também chamado de fase branda, é caracterizado por um perfil sintomatológico semelhante a um quadro gripal, apresentando febre, tosse seca, mialgia e anosmia ou até mesmo pode se apresentar na forma assintomática. Neste estágio, também podem ocorrer sintomas menos comuns como diarreias, dores de cabeça, náuseas e alterações oftálmicas. (161)

A expressiva resposta inflamatória gerada nessa infecção pode fazer com que a doença progrida para a fase severa, sendo essa progressão dependente da resposta imunológica do hospedeiro e a existência de comorbidades associadas. (159) Esse estágio mais grave da doença é caracterizado por uma debilitação respiratória grave, com saturação de oxigênio igual ou abaixo de 93%, infiltrados pulmonares, arritmias, alterações na coagulação e complicações trombóticas, tornando necessária a internação do paciente com intubação respiratória e podendo levar ao óbito. (159,162) Nesta fase, alguns sintomas mais críticos também podem ocorrer, como acidose metabólica, choque séptico e falência múltipla dos órgãos. (158)

Em relação ao diagnóstico, a detecção do material genético viral é considerado o método de escolha para a confirmação da COVID-19 e é realizado através da coleta de amostras nasofaríngeas ou de saliva, durante a fase de viremia da doença (1 a 7 dias do aparecimento dos sintomas). (163) O método utilizado é a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR), que possibilita a amplificação e assim a detecção do RNA viral. Para esta fase, também estão disponíveis testes rápidos de detecção de antígenos virais, que são baseados no método de imunocromatografia e que fornecem um resultado qualitativo em alguns minutos. (164) Já os métodos sorológicos, são utilizados para as fases pós viremia e também para verificar o contato prévio com o vírus, e baseiam-se na detecção de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 em amostras de soro, através de ensaios imunoenzimáticos ou de quimioluminescência. (165) Adicionalmente, exames de imagem como a tomografia computadorizada e radiografias consistem importantes ferramentas auxiliares de diagnóstico e para o acompanhamento da evolução clínica dos pacientes. (163)

Ao contrário dos métodos de diagnóstico que foram rapidamente estabelecidos e padronizados para o SARS-CoV-2, o desenvolvimento de tratamentos eficazes inicialmente andou a passos bem mais lentos, uma vez que a COVID-19 ainda estava sendo compreendida quanto aos seus aspectos fisiopatológicos. Assim, diante da grave situação, surgiu uma urgência pela busca e tentativa de tratamentos experimentais e também as estratégias de reposicionamento de fármacos. (154) A partir disso, com os esforços de vários grupos de pesquisa ao redor do mundo, progressos significativos foram alcançados e resultaram no desenvolvimento de vacinas e novas abordagens terapêuticas em uma velocidade sem precedentes. (154)

Sendo assim, opções de tratamento para a COVID-19 vem surgindo e algumas delas já estão disponíveis para uso emergencial em alguns países e outras ainda estão sob avaliação dos órgãos regulatórios. Os antivirais como molnupiravir (166), nirmatrelvir (167) e remdesivir (168) e também anticorpos monoclonais como as associações bamlanivimab/etesevimab (169) (BLAZE-1), casirivimab/imdevimab (REGN-COV2) (170) e sotrovimab, surgem como possibilidades de tratamento durante o estágio de replicação viral. (154) Para a fase mais inflamatória da doença, anti-inflamatórios corticosteroides como a dexametasona (171) e também agentes imunomoduladores (baricitinib (172), tocilizumab (173)), bem como a combinação destes, também são considerados como possibilidades de tratamento. (154)

No que se refere a profilaxia da COVID-19, as medidas de saúde pública e controle de infecção são de suma importância para prevenir ou diminuir a transmissão do SARS-CoV-2. No entanto, o passo mais crucial para a contenção desta pandemia global é a vacinação da população. Atualmente, esse cenário se apresenta com a seis vacinas aprovadas, que já estão sendo disponibilizadas para a população e que foram desenvolvidas baseadas em diferentes plataformas vacinais. (154)

Dentre elas, a Coronavac é uma vacina de vírus inativado, desenvolvida pela indústria chinesa Sinovac, a qual foi realizada a transferência de tecnologia para o Instituto Butantan. As vacinas baseadas em vetor viral não replicativo (Adenovírus) são as desenvolvidas pela Janssen, Oxford/AstraZeneca e também a vacina russa SputnikV desenvolvida pelo Instituto Gamaleya. A tecnologia das plataformas de vacinas de RNA mensageiro também teve notórios avanços, com o desenvolvimento das vacinas da Pfizer e a da Moderna. (154) No Brasil, as vacinas que encontram-se aprovadas pelos órgãos regulatórios e disponíveis para a vacinação da população são a Coronavac, a Oxford/AstraZeneca, a da Pfizer e a da Janssen.

(174) Além dessas, outras vacinas estão em fase de desenvolvimento e os estudos clínicos vem sendo conduzidos em vários países ao redor do mundo.

Apesar das vacinas representarem um grande avanço no manejo da pandemia, ainda se faz necessária e imprescindível continuar a busca por alternativas terapêuticas, como os antivirais, uma vez que a cobertura vacinal e a emergência de novas variantes sugerem que casos de COVID-19 ainda continuarão a acontecer.

7.3 Genoma, proteínas e replicação do vírus SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 pertence a família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus* e é um vírus envelopado, com RNA de fita simples com polaridade positiva. O seu genoma é considerado o maior comparado ao demais vírus de RNA (aproximadamente 30 kb) (**Figura 19**) e codifica para duas poliproteínas (pp1a e pp1b), que ao serem clivadas originam 16 proteínas não estruturais. Essas proteínas participam do processo de replicação viral e interação com fatores do hospedeiro. (175) O genoma também codifica para genes estruturais, originando quatro proteínas (S, N, M e E), que tem como funções a montagem da estrutura viral, interação com receptores celulares, entrada do vírus na célula e a interação com anticorpos. (176-177) Adicionalmente, o genoma também apresenta os genes acessórios, que originam sete proteínas acessórias (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8 e 9b) cujas funções específicas ainda não são completamente elucidadas. Tanto para as proteínas estruturais quanto acessórias, a tradução ocorre via RNAs subgenômicos (sgRNA) recém-sintetizados nas células infectadas. (175)

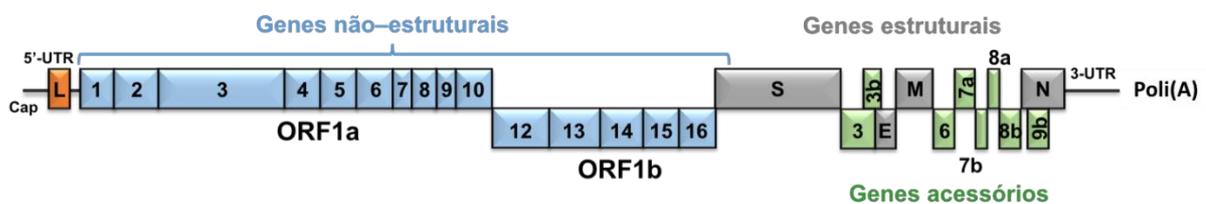


Figura 19 - Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2. Em azul claro estão os quadros de leitura aberta (ORF1a e ORF1b) que codificam para as 16 proteínas não estruturais. Em cinza, a ORF que codifica para as quatro proteínas estruturais e em verde os genes que codificam para as proteínas acessórias.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as proteínas não estruturais, nsP1 atua afetando a maquinaria da célula hospedeira através da ocupação do canal de ligação ao mRNA do ribossomo, impedindo então a tradução de proteínas celulares. (158) A nsP2 se liga as proteínas proibitinas 1 e 2 da célula hospedeira e também exerce influência no ambiente celular. A nsP3 possui o domínio protease (PLpro, do inglês *papain like protease*) que é responsável pelo processamento da

poliproteína viral e também possui atividade de desubiquitinação das proteínas celulares, contribuindo nos processos de evasão da resposta imune. (175) As nsP4 e nsP6 formam vesículas de dupla membrana associadas aos complexos de replicação e tradução. (178) A nsP5 (Mpro ou 3CLpro, do inglês *main protease* ou *chymotrypsin like protease*, respectivamente) também apresenta a função de protease e participa do processamento da poliproteína viral, juntamente com a PLpro. (179)

A nsP12 é a RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável pela elongação do RNA viral e também possui atividade de nucleotidiltransferase. As nsP7 e nsP8 são fatores acessórios que atuam juntamente com a nsP12, aumentando significativamente a ligação da nsP12 ao primer de RNA. (158) Além disso, a nsP8 também apresenta função de primase e atividade de adenililtransferase (TATase). A nsP9 é uma proteína de ligação ao RNA e a nsP13 possui atividade de helicase. (178) A nsP14 é uma exoribonuclease e também tem atividade de guanosina-N7 metiltransferase (N7-MTase), realizando o capeamento do RNA. A nsP15 é uma endoribonuclease uridina-específica e também atua como um antagonista de interferon e a nsP5 é uma ribose 2'-O-metiltransferase, atuando também no capeamento do RNA genômico. Por fim, a nsP10 atua como cofator para as proteínas nsP14 e nsP16. (178)

Em relação as proteínas estruturais, são elas: *spike* ou superfície (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídica (N). De forma geral, as proteínas S, M e E são incorporadas ao envelope para a formação da partícula viral, caracterizando a sua estrutura. (180) A proteína S, apresenta-se em uma organização trimérica e participa diretamente na ligação ao receptor celular da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2, do inglês *angiotensin-converting enzyme 2*), possibilitando a entrada do vírus nas células susceptíveis e assim iniciando o processo de infecção. (181) A proteína E atua formando um canal iônico na membrana viral e provavelmente também exerce influência na patogenicidade. Já a M, é uma glicoproteína transmembrana importante para a morfogênese e brotamento viral, pois realiza interações diretas com as proteínas S, E e N. (178) A proteína N se liga ao RNA genômico e faz o seu empacotamento como um complexo ribonucleoproteico. (182) Em relação as proteínas acessórias, suas funções específicas ainda são insuficientemente compreendidas, mas acredita-se que elas possam atuar na regulação da resposta do hospedeiro e na adaptação viral. (178)

A infecção pelo SARS-CoV-2 inicia com o ancoramento na célula alvo através da interação da proteína S com os receptores ACE2. (176) A serinoprotease transmembrana humana 2 (TMPRSS2, do inglês *transmembrane serine protease 2*), presente na membrana

celular, realiza uma clivagem na proteína S que resulta em alterações estruturais que ativam essa proteína e permitem a fusão do vírus com a membrana celular. (183) Tanto os ACE2 quanto TMPRSS2 são expressos em vários tipos de células, mas apresentam alta expressão em células do pulmão, epitélio intestinal e células endoteliais. (183)

Após a fusão, o RNA genômico (gRNA) é liberado no citoplasma e ocorre a descompactação das ligações com as proteínas N, através da ação das proteases celulares. (178) Por ser um vírus de RNA com polaridade positiva, o seu gRNA já atua diretamente como mRNA, iniciando a tradução das ORF1a e ORF1b em poliproteínas e também serve de molde para a síntese do RNA complementar de polaridade negativa. As poliproteínas geradas são processadas pelas proteases PLpro e Mpro, liberando as proteínas virais, que irão interagir e formar o complexo de replicação e transcrição viral. (178)

Subsequentemente, é iniciada a síntese do RNA subgenômico (sgRNA) e esse processo ocorre dentro de vesículas dupla membrana. Os sgRNA recém sintetizados saem dessas vesículas e codificam as proteínas estruturais e as proteínas acessórias, que são liberadas. (184) Por fim, novos gRNA são gerados, encapsulados pelas proteínas N e envolvidos pelo envelope viral. (182) Sendo assim, as novas partículas virais montadas são liberadas para infectar outras células e continuar o processo de disseminação do SARS-CoV-2. (178)

7.4 Proteína PLpro do SARS-CoV-2 como alvo para a busca de inibidores

A proteína **nsP3** (~200 kD), uma proteína multifuncional que compreende até 16 domínios e regiões diferentes. O domínio proteolítico da nsP3 é conhecido como PLpro, que apresenta como principal função o processamento da poliproteína viral, sendo essa ação de forma conjunta e coordenada com a protease principal, denominada Mpro (do inglês, *main protease*). (175)

A PLpro faz parte da classe das cisteíno-proteases e apresenta enovelamento semelhante à papaína (“*Papain-like fold*”). (185) Seu sítio ativo possui geometria semelhante ao da PLpro do SARS-CoV e é formado pela tríade catalítica que consiste em cisteína, histidina e um ácido aspártico (C112, H273 e D286). (186) Além disso, apresenta quatro subsítios, também chamados de bolsos, que são os S1, S2, S3 e S4. A PLpro reconhece os motivos tetrapeptídicos do tipo LXGG, localizados na poliproteína viral pp1a e hidrolisa a ligação peptídica no lado carboxílico da glicina na posição P1, liberando as proteínas nsP1, nsP2 e nsP3. (187) Ao contrário da Mpro, a PLpro reconhece uma maior diversidade de

substratos. (179) Os subsítios S1 e S2 ligam-se apenas aos resíduos de glicina, enquanto o subsítio S3 tolera grupos aromáticos, hidrofóbicos e carregados positivamente. Já os S4, reconhece apenas resíduos hidrofóbicos e tem preferência por leucina. (187)

Em relação a estrutura tridimensional da PLpro de SARS-CoV-2, esta já foi resolvida experimentalmente e disponibilizada através dos códigos de identificação PDB ID: 7CMD (186), 6WX4 (188) e 6W9C (ainda não publicada) (**Figura 20**)

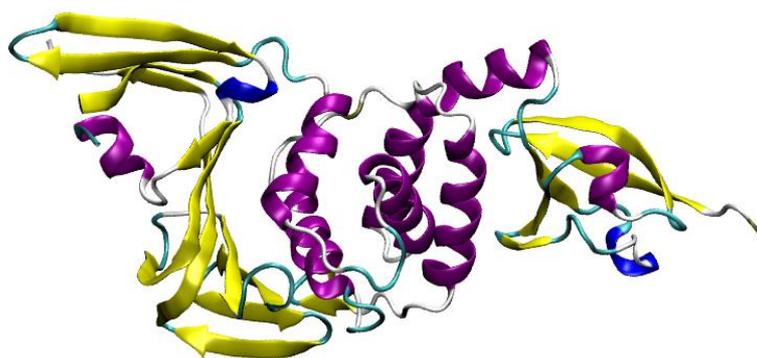


Figura 20 - Estrutura tridimensional da PLpro de SARS-CoV-2, resolvida experimentalmente através de Difração de Raios-X (PDB ID: 7CMD (186)). A representação foi colorida por perfil de estrutura secundária, onde as folhas estão representadas em amarelo, as hélices em roxo e azul, e as estruturas de voltas em ciano.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além da função de processamento, a PLpro também participa da resposta viral de evasão ao sistema imune através da sua atividade de desubiquitinação, afetando a etapa de modificação pós traducional das células hospedeiras. (175,189) Devido a essas funções relevantes no processo de replicação do SARS-CoV-2, a PLpro é uma enzima que vem sendo amplamente estudada como um interessante alvo para a busca de fármacos inibidores para o tratamento da COVID-19. (175)

Dessa forma, ao inibir a função desta enzima, o processamento da poliproteína estaria comprometido e conseqüentemente a replicação não ocorreria de forma efetiva, reduzindo a carga viral no hospedeiro. (179) Adicionalmente, a inibição da PLpro, também favoreceria o reestabelecimento da resposta imune inata do hospedeiro, auxiliando na recuperação da infecção. (179)

8 OBJETIVOS

De forma complementar, e como parte do esforço emergencial do CIBFar/CEPID para contribuir com pesquisas relacionadas à pandemia de COVID-19, foi incluído o projeto de busca por moléculas antivirais para o alvo protease PLpro do vírus SARS-CoV-2. Dessa forma, foram adicionados os seguintes objetivos a serem conduzidos neste projeto de doutorado e que serão apresentados no Capítulo II:

- 10 Clonagem do gene codificante em vetores de expressão visando máxima expressão solúvel da PLpro;
- 11 Otimização das condições de expressão e purificação proteica;
- 12 Padronização de ensaio de atividade enzimática da PLpro;
- 13 Triagem de candidatos a inibidores da PLpro através de ensaio de ponto único;
- 14 Avaliação da inibição através de ensaios de concentração-resposta;
- 15 Ensaios celulares de inibição de replicação viral;
- 16 Publicação dos dados em revistas científicas internacionais.

9 METODOLOGIA

9.1 Clonagem e expressão em larga escala da PLpro de SARS-CoV-2

A sequência para o fragmento gênico codificante da proteína PLpro de SARS-CoV-2 foi identificada e amplificada a partir do cDNA procedente de amostras de SARS-CoV-2 inativadas, fornecidas pelo grupo do Prof. Edison Durigon do ICB-USP. O produto da amplificação foi enviado ao grupo do Prof. Flávio H. da Silva (Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos - São Paulo, Brasil) onde foi clonado em vetor de expressão pET-28 e gentilmente disponibilizado ao nosso grupo. Essa construção contém uma cauda de hexa-histidina (*6Xhis-tag*) na região C-terminal. O vetor foi transformado em cepas bacterianas *E. coli* Rosetta e a expressão em larga escala da proteína foi realizada em meio LB (Lauria Bertani), onde as culturas bacterianas foram crescidas sob agitação a 37 °C até que as densidades ópticas a 600 nm ($D.O_{600\text{ nm}}$) atingissem 0,6. Na sequência, a expressão foi induzida por 0,5 mM de IPTG e 1 mM de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) e após a indução, as culturas foram mantidas a 18°C por 20 horas. Ao final do período de expressão, as células foram separadas por centrifugação e ressuspendidas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol e 2 mM de DTT). Foi realizada a etapa de lise química utilizando 250 µg/mL de lisozima e 10 U/mL de benzonase (Cellco Biotec). Em seguida, as células foram submetidas a lise celular mecânica através de desmembramento ultrassônico (sonicação) e após isso, o lisado celular obtido foi centrifugado a 12.000 x g, durante 30 min e a 4°C, para a obtenção da fração solúvel.

9.2 Purificação da PLpro de SARS-CoV-2

Todas as etapas de purificação foram realizadas por métodos cromatográficos, utilizando sistema semi-automatizado ÄKTA Pure 25 (GE Healthcare) com monitoramento da absorvância em $\lambda = 280\text{ nm}$ (UV) e condutividade. A primeira etapa foi a cromatografia por afinidade a metal imobilizado (IMAC) utilizando a coluna Histrap HP. A fração solúvel, separada na centrifugação, foi passada na coluna utilizando uma bomba de eluição e em seguida foi conectada ao AKTA para as etapas de lavagem e eluição. A eluição ocorreu com tampão contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol e 1mM DTT e a fração eluída foi coletada. A segunda etapa cromatográfica de purificação foi a gel filtração, utilizando a coluna Superdex 75 16/60 e o tampão de gel filtração (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl e 1 mM TCEP). A pureza da amostra e seu progresso durante as etapas de

purificação foram acompanhadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). As amostras finais de proteína foram concentradas utilizando concentradores MWCO (Vivaspin, Sartorius) com tamanho de corte de 10 kDa até atingir a concentração de estocagem e foi adicionado 5% de glicerol antes do armazenamento em freezer a -80°C . A concentração da proteína foi determinada utilizando espectrofotômetro Nanodrop 1000 spectrophotometer, considerando as absorbâncias medidas a 280 nm e o coeficiente de extinção teórico de $45.270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

9.3 Ensaios de inibição da atividade enzimática

O ensaio de atividade enzimática da PLpro SARS-CoV-2 foi padronizado utilizando diferentes concentrações de enzima e do substrato enzimático fluorescente, a fim de obter as condições adequadas de detecção de intensidade de fluorescência para o ensaio. O substrato enzimático fluorescente utilizado foi o Abz-TLKGG//APIKQ-EDDnp, que possui em suas extremidades as sondas fluorescentes Abz (ácido aminobenzóico) e EDDnp (2,4-dinitrofenil-etilenodiamina). Este substrato foi sintetizado e gentilmente disponibilizado pela Profa. Maria Aparecida Juliano (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, Brasil). Para os ensaios, foi padronizada a concentração final da enzima de 70 nM, o substrato fluorescente na concentração final de 127 μM e o ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços. A proteína foi diluída em tampão de ensaio (50 mM HEPES pH 7.5, 0.01 % Triton e 5 mM DTT) e incubada com 10 μM de cada composto ou peptídeo, a 37°C durante 30 minutos. Após isso, o substrato diluído em tampão de ensaio foi adicionado e a atividade enzimática mensurada em espectrofluorímetro Spectramax Gemini EM (Molecular devices), com $\lambda_{\text{ex}}=320 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=420 \text{ nm}$, a 37°C durante 30 minutos.

9.4 Triagem de compostos através do ensaio de inibição enzimática de ponto único

Os compostos e peptídeos disponíveis em laboratório foram agrupados em cinco diferentes séries, gerando um total de 1265 moléculas. A série de Inibidores de Proteases (9 proteínas) foi obtida através de colaboração com a Profa. Maria Luiza Vilela Oliva (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo – Brasil) e as séries de Peptídeos Hecates (45 peptídeos) e Peptídeos derivados da Bothopstoxina-I (11 peptídeos) foram sintetizadas e fornecidas em colaboração com o Prof. Eduardo Maffud Cilli (Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara, Brasil). Já as séries *Pandemic Response Box* (400 compostos), *Pathogen Box* (400 compostos) e *Malaria Box*

(400 compostos) são provenientes da organização internacional *Medicines for Malaria Venture* (MMV). Os compostos ou peptídeos que apresentaram percentual de inibição da atividade enzimática de no mínimo 70% foram selecionados e foram testados no ensaio seguinte de concentração-resposta (IC_{50}).

9.5 Ensaios de concentração-resposta (IC_{50})

Os ensaios de concentração-resposta foram realizados para obter os valores de concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}). As concentrações de enzima e substrato fluorescente foram mantidas de acordo com a padronização e os compostos ou peptídeos foram diluídos serialmente em uma faixa de 10 μ M a 0.02 μ M. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram analisados através do *software* Origin, utilizando o ajuste a função de Hill para obter o IC_{50} para cada composto ou peptídeo.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Obtenção da PLpro de SARS-CoV-2 purificada

O protocolo utilizado para as etapas de clonagem e expressão, bem como o protocolo adotado para a purificação da PLpro foram padronizados e possibilitaram a obtenção da proteína purificada. O domínio PLpro de SARS-CoV-2 faz parte da proteína nsP3 e é formado por 318 aminoácidos, apresentando peso molecular estimado de 35.903 Da (35,90 kDa). A construção utilizada contém o domínio característico peptidase e os resíduos catalíticos cisteína C112 e a histidina H273, que são responsáveis pela sua função (**Figura 21A**).

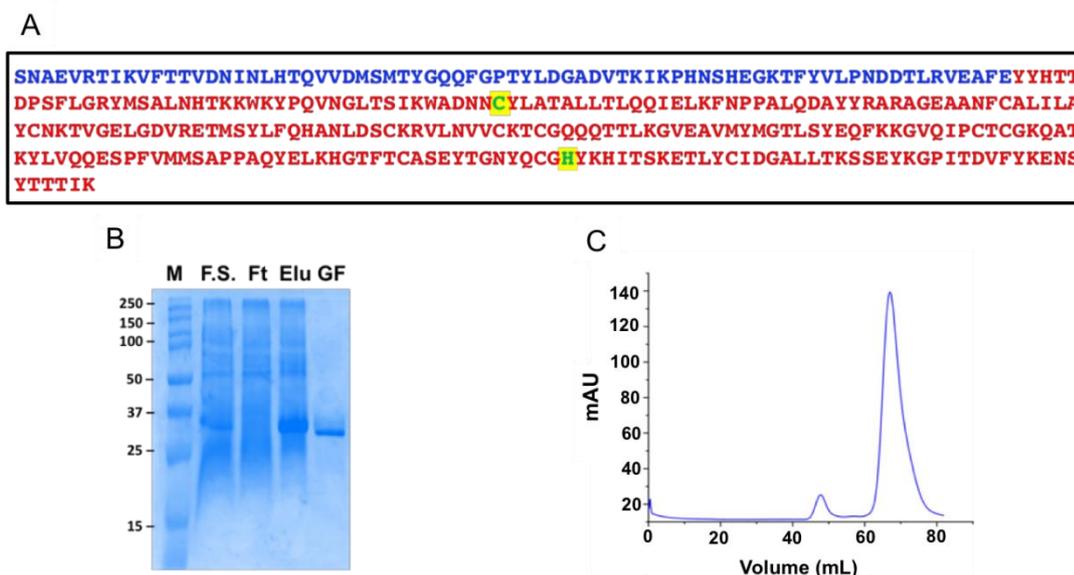


Figura 21 - **A**) Sequência de aminoácidos da proteína PLpro de SARS-CoV-2. Em vermelho, região da sequência aonde está localizado o domínio peptidase. Em verde e destacado de amarelo, as CYS112 e HIS 273, que formam o sítio catalítico. **B**) Gel de acrilamida 12,5% das frações eluídas durante a gel filtração: M, marcador de peso molecular; F.S., fração solúvel do lisado pós centrifugação; Ft, fração que não se ligou na coluna, também chamada de “*flow through*”; Elu, eluição da proteína na primeira etapa de afinidade; GF, fração correspondente ao pico da gel filtração, onde está presente a PLpro de SARS-CoV-2 purificada (35,90 kDa). **C**) Cromatograma obtido na etapa de purificação de gel filtração.

Fonte: Elaborada pela autora.

A PLpro foi obtida em sua forma solúvel e os contaminantes foram eliminados ao longo das duas etapas de purificação (**Figura 21B**). Na última etapa, de gel filtração, foi possível observar o aparecimento do pico principal referente a PLpro (**Figura 21C**), com volume de retenção de aproximadamente 62 mL. As frações referentes ao pico foram coletadas e a presença da proteína confirmada através de um gel de poliacrilamida (**Figura 22B**).

10.2 Triagem de compostos através do ensaio de inibição enzimática de ponto único

Com a obtenção da PLpro pura e ativa, foi possível iniciar a busca por moléculas inibidoras. Para os ensaios de triagem foram utilizadas moléculas pertencentes a séries disponíveis no laboratório e provenientes de grupos colaboradores. Para isso, foram realizados ensaios enzimáticos de ponto-único, utilizando o substrato específico da PLpro Abz-TLKGG//APIKQ-EDDnp, que possui região de clivagem correspondente a sequência encontrada na junção entre as nsP2 e nsP3 na poliproteína viral. Este substrato possui em suas extremidades as sondas fluorescentes Abz (ácido aminobenzóico) e EDDnp (2,4-dinitrofenil-etilenodiamina) e, quando ocorre a clivagem do substrato pela enzima, tem-se a liberação do EDDnp, permitindo a detecção do processo através da fluorescência. Sendo assim, ao adicionar a molécula, caso ela tenha efeito inibitório, irá causar uma diminuição da clivagem do substrato pela enzima e, dessa forma, é feita a medição da atividade catalítica remanescente da enzima frente a adição do inibidor.

Nesta etapa, foram avaliadas um total de 1265 moléculas e as que causaram uma inibição da atividade enzimática superior a 70% foram consideradas para a próxima etapa (**Tabela 8**). Dentre o total de compostos e peptídeos avaliados, 26 (correspondendo a aproximadamente 2% do total) seguiram para os ensaios de concentração-resposta para a determinação da concentração inibitória de 50% da atividade da enzima, o IC₅₀. A próxima seção que descreve os resultados obtidos para esses ensaios foi dividida para cada série avaliada.

Tabela 8 - Séries de moléculas utilizadas nos ensaios de ponto-único para triagem de moléculas inibidoras. Estão apresentados os números de compostos/peptídeos de cada série e o número de compostos/peptídeos que apresentaram inibição da atividade enzimática superior a 70%.

SÉRIE	N.º DE COMPOSTOS/PEPTÍDEOS	INIBIÇÃO > 70%
Inibidores de Proteases	9	6
MMV Pandemic Response Box	400	4
MMV Pathogen Box	400	0
MMV Malaria Box	400	0
Peptídeos Hecates	45	5
Peptídeos derivados da Bothropstoxina-I	11	11

Fonte: Elaborada pela autora.

10.3 Ensaios de concentração-resposta (IC₅₀)

10.3.1 Série de Inibidores de Proteases

A série de Inibidores de Proteases foi obtida em colaboração com a Profa. Maria Luiza Vilela Oliva (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo – Brasil) e é composta por 9 proteínas inibidoras de proteases, provenientes de plantas brasileiras e com algumas modificações no que se refere ao seu processo de obtenção (forma nativa e forma recombinante). Nesta série, 6 inibidores causaram a efeito de inibição da PLpro e foram testados no ensaio de concentração-resposta (**Tabela 9**). As curvas obtidas neste ensaio, bem como os resultados de IC₅₀ obtidos para cada componente da série estão demonstrados na **Figura 22**.

Tabela 9 - Descrição da série de Inibidores de Proteases que apresentaram inibição superior a 70%, com os seus respectivos códigos de identificação, nomes e pesos moleculares (em kDa) e valores de IC₅₀ (com o desvio padrão e em micromolar).

Código	Inibidor de Protease	P.M. (kDa)	IC ₅₀ (μM)
#A	BbCI (<i>Bauhinia bauhinoides</i> – inibidor de cruzipaína)	18,00	2,93 ± 0,01
#B	BbKI (<i>Bauhinia bauhinoides</i> – inibidor de calicreína)	18,40	1,90 ± 0,1
#C	BbKI (<i>Bauhinia bauhinoides</i> – inibidor de calicreína) - recombinante	18,40	1,90 ± 0,03
#D	EcCI (<i>Enterolobium contortisiliquum</i> – inibidor de cisteína)	18,00	2,34 ± 0,01
#E	BbCI (<i>Bauhinia bauhinoides</i> - inibidor de cruzipaína) - recombinante	18,00	5,77 ± 0,04
#G	CrataBL (<i>Crateava tapia</i> lectin activity)	20,40	0,69 ± 0,02

Fonte: Elaborada pela autora.

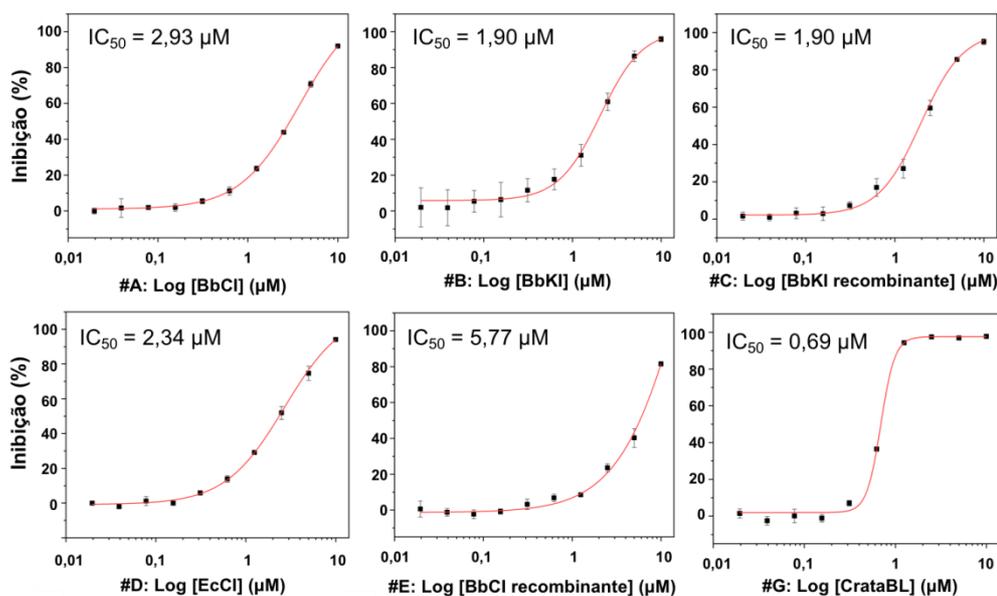


Figura 22 - Curvas de concentração-resposta para a série de Inibidores de Proteases e os seus valores de IC_{50} .
Fonte: Elaborada pela autora

Como é possível observar, todos os inibidores apresentaram valores de IC_{50} inferiores a 10 μM . Dentre eles, o CrataBL (#G), foi o que apresentou um menor valor de IC_{50} (0,69 μM), com concentração na ordem de nanomolar. Este peptídeo possui atividade lectínica e é proveniente da casca da espécie *Crateava tapia*, conhecida popularmente como tapiá, cabaceira ou pau-d'alho. A estrutura tridimensional do CrataBL já foi resolvida através de difração de raios-X e depositada em banco de dados (PDB ID: 4IHZ e 4II0). (190) Em relação a sua atividade biológica, já foram reportadas a moderada inibição da tripsina (190), propriedades anticoagulantes (191), antitumorais (190,192), anti-inflamatórias e analgésicas. (192) Adicionalmente, propriedades inseticidas também foram relatadas para o CrataBL. (193)

Além do CrataBL, também foram avaliados os inibidores de protease originários das sementes da planta *Bauhinia bauhinoides*, denominados BbKI (PDB ID: 2GO2, não publicada) e BbCI (PDB ID: 2GZB (194)), que são homólogos. Os códigos #B e #C são denominados respectivamente BbKI nativo e BbKI recombinante e são classificados como inibidores de caliceína, que é uma serino protease. Nos ensaios com a PLpro, eles demonstraram inibição da atividade enzimática com IC_{50} de 1,90 μM , sem haver diferença no perfil de inibição entre as formas nativa e a forma recombinante deste inibidor. A comparação entre as atividades enzimáticas dessas duas formas do BbKI já havia sido reportada,

demonstrando propriedades inibitórias idênticas entre eles, assim corroborando com os dados obtidos para a inibição da PLpro no presente trabalho. (195)

Já os BbCI, também provenientes das sementes da *Bauhinia bauhinoides*, são inibidores da cruzipaina, que é uma cisteína protease de *Trypanosoma cruzi*. O #A é o BbCI em sua forma nativa, que apresentou IC₅₀ de 2,93 µM e o #E é o BbCI em sua forma recombinante obtida através de expressão heteróloga, que apresentou IC₅₀ de 5,77 µM. Em um estudo que comparou a atividade dessas duas formas, também foi observada a diferença de afinidade e efeito inibitório da BbCI nativa e recombinante sobre a catepsina L e a elastase neutrofílica humana. (195) Entretanto essas diferenças também não foram tão expressivas e ocorreram dentro de uma mesma ordem de grandeza. Em relação as propriedades biológicas já reportadas para os BbKI e BbCI, destaca-se a ação anti-inflamatória bem estabelecida para esses peptídeos (196–198), e também as propriedades antitumorais (199) e antitrombóticas. (200)

Por fim, o EcCI é um inibidor de cisteína proteases, proveniente das sementes da planta *Enterolobium contortisiliquum*, popularmente conhecida como orelha-de-macaco ou timbaúba. Esse peptídeo teve ação inibitória na atividade da PLpro, com IC₅₀ de 2,34 µM. Para este peptídeo ainda não está disponível a estrutura tridimensional e estudos vem sendo conduzidos em relação as suas propriedades anti-inflamatórias (201). Interessantemente, dentro desta série, o EcTI (PDB ID 4J2K e 4J2Y (202), que é um inibidor de serino protease proveniente desta mesma planta, não foi efetivo na inibição da PLpro.

Como apresentado nesta seção, esses inibidores de protease (CrataBL, BbKI, BbCI e EcCI) já foram estudados em relação a algumas atividades biológicas, no entanto, propriedades antivirais ainda não haviam sido reportadas. Diante disso, os resultados de inibição da PLpro abrem perspectivas para a realização de testes adicionais, como a avaliação da atividade em culturas virais, que já foram iniciados em colaboração e encontram-se em andamento. Assim, esses resultados e a continuidade do estudo com essa série gera possibilidades para a utilização destes inibidores no tratamento de doenças virais, em especial a infecção causada pelo SARS-CoV-2.

10.3.2 MMV Pandemic Response Box

A série de compostos *MMV Pandemic Response Box* da organização internacional *Medicines for Malaria Venture (MMV)* é composta por 5 placas (A, B, C, D e E) e totaliza 400 diferentes compostos para triagens contra doenças infecciosas e negligenciadas. Esses

compostos são pertencentes as classes dos antimicrobianos, antivirais e antifúngicos e já são moléculas aprovadas ou que encontram-se em fase de desenvolvimento.

Nesta série, quatro compostos causaram a inibição da PLpro de SARS-CoV-2 e foram testados no ensaio de concentração-resposta (**Tabela 10**). As curvas obtidas neste ensaio, bem como os resultados de IC_{50} obtidos para cada um dos compostos estão demonstrados na **Figura 23**.

Tabela 10 - Descrição da série de compostos do MMV Pandemic Response Box que apresentaram inibição superior a 70%, com os seus respectivos códigos de identificação, nomes, classes farmacológicas e valores de IC_{50} (em micromolar).

Placa	Código	Nome do composto	Classe	IC_{50} (μ M)
B (D07)	MMV1579849	P-113D	Antimicrobiano	$5,60 \pm 0,1$
B (H06)	MMV002459	Tobramicina	Antimicrobiano	$14,79 \pm 0,08$
C (E05)	MMV1634402	Brilacidin	Antimicrobiano	$6,93 \pm 0,02$
E (G02)	MMV1634397	15C	Antiviral	$1,64 \pm 0,1$

Fonte: Elaborada pela autora.

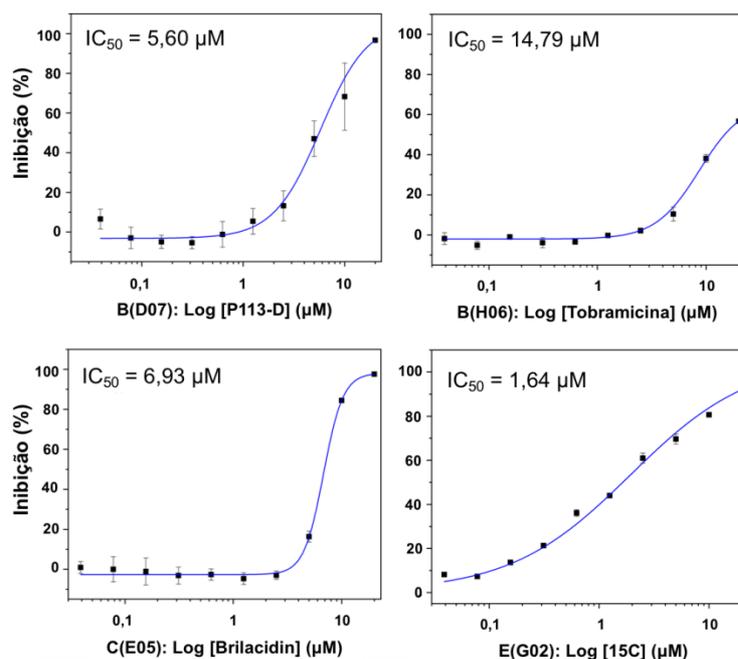


Figura 23 - Curvas de concentração-resposta para a série de compostos MMV Pandemic Response Box e os valores de IC_{50} .

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre os compostos que prosseguiram para os ensaios de concentração-resposta, o composto da placa E (G02) denominado 15C apresentou o maior potencial de inibição, com IC_{50} de $1,64 \mu$ M. A atividade antiviral de inibição da PLpro do vírus SARS-CoV deste composto foi previamente descrita em um estudo conduzido por Ghosh e colaboradores. (203) Neste estudo, este composto foi testado em um ensaio de inibição enzimática resultando em

um IC_{50} de 0,34 μ M e também confirmado através de ensaio celular utilizando células Vero E6 infectadas com o vírus, resultando em uma inibição com EC_{50} de 10,2 μ M. (203) Tendo em vista estes resultados e considerando a alta similaridade entre os coronavírus SARS-CoV e SARS-CoV-2, é possível sugerir que o composto 15C apresenta-se como um candidato promissor para a realização de mais estudos, visando o desenvolvimento de tratamentos específicos para a infecção por esses coronavírus.

Seguindo com os resultados obtidos nesta série, o composto da placa B (D07), denominado P-113D, foi capaz de inibir a atividade da PLpro com IC_{50} de 5,60 μ M. O P-113D é um derivado de histatinas, que são pequenos peptídeos ricos em histidina e com propriedades antimicrobianas. Sua atividade foi avaliada em um estudo conduzido por Giacometti e colaboradores (2005) e mostrou potente efeito antimicrobiano *in vitro* em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Staphylococcus aureus* (204). O P-113D também teve a sua atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* demonstrada *in vivo* em modelos animais. (205)

O terceiro composto dessa série foi o Brilacidin (placa C, E05), que inibiu a atividade da PLpro, apresentando IC_{50} de 6,93 μ M. Esse composto é uma molécula sintética não peptídica, mimética de peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs, do inglês *Host Defense Proteins/Peptides*). Possui atividade antimicrobiana de amplo espectro *in vitro* contra bactérias patogênicas gram-negativas e gram-positivas e boa eficácia em ensaios clínicos com atividade contra *S. aureus* (206). A utilização desse tipo de molécula em infecções virais já foi reportada e recentemente, o Brilacidin foi testado através de ensaios celulares utilizando células Vero infectadas com o vírus SARS-CoV-2 e demonstrou diminuição do título viral e inibição de 53% da infecção (10 μ M). (207) Assim, foi sugerida que a ação do Brilacidin ocorre através da inibição da entrada viral e de etapas iniciais pós entrada. Além disso, também foi demonstrada a diminuição nas cópias de RNA genômico produzidas de forma tardia, demonstrando que o efeito inibidor também estaria ocorrendo a nível intracelular. (207)

Correlacionando as informações fornecidas por esse estudo com os resultados obtidos no ensaio de inibição da PLpro, pode-se sugerir que o efeito intracelular de inibição da replicação ocorra com a inibição da PLpro, impactando nas funções de processamento e replicação desempenhadas por ela. Evidentemente, uma investigação aprofundada da avaliação deste composto a nível de replicação seria necessária para uma maior confirmação, porém os dados aqui apresentados fornecem indícios da PLpro como alvo e reforçam a

possibilidade de utilização do Brilacidin no tratamento da infecção causada pelo SARS-CoV-2.

Por fim, o último composto dessa série que inibiu a PLpro foi a Tobramicina (Placa B, H06), apresentando um IC_{50} de 14,79 μ M. A Tobramicina é um antimicrobiano pertencente a classe dos aminoglicosídeos e é amplamente utilizado no tratamento de infecções bacterianas, principalmente aquelas causadas por agentes gram-negativos. A investigação do efeito antiviral da tobramicina foi conduzida em um estudo clínico de fase 2, onde foi avaliado o efeito deste composto no tratamento de conjuntivite viral. (208) Apesar dessa ação antiviral, mais estudos são necessários para reforçar o possível efeito da Tobramicina especificamente na infecção por SARS-CoV-2. No entanto, os dados de inibição aqui apresentados são motivadores, uma vez que é um antimicrobiano já aprovado e que pode ser administrado de forma inalatória, o que seria interessante devido a localização do vírus nas vias aéreas durante o curso da infecção e assim abrindo possibilidades para o desenvolvimento de um tratamento tópico e com menores efeitos adversos.

10.3.3 Peptídeos Hecates

A série de Peptídeos Hecates foi obtida em colaboração com a Prof. Eduardo Maffud Cilli (Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara, Brasil) e é composta por 45 peptídeos sintéticos derivados do Hecate. Nesta série, 5 peptídeos causaram a inibição da PLpro de SARS-CoV-2 e foram testados no ensaio de concentração-resposta (**Tabela 11**). As curvas obtidas neste ensaio, bem como os resultados de IC_{50} obtidos para cada um dos peptídeos estão apresentados na **Figura 24**.

Os Hecates (FALALKALKKALKKALKKAL) são peptídeos análogos da melitina, formados por 23 aminoácidos com alta incidência de lisinas (positivos), leucinas e alaninas (apolares) e que possuem características semelhantes a outros peptídeos antimicrobianos como a carga positiva, alto número de aminoácidos hidrofóbicos e estrutura helicoidal (209). Por serem peptídeos líticos, vários estudos mostram as propriedades antitumorais dos Hecates, no entanto, o mecanismo de ação específico nesta função ainda não foi completamente elucidado. (210–212)

Os compostos e peptídeos conjugados constituem uma nova classe de moléculas de interesse biológico para o tratamento de doenças, e nesse caso, a possibilidade de conjugação do Hecate com outras moléculas torna-se uma abordagem interessante para o desenvolvimento de novos compostos ativos. (209) Sabe-se que a região N-terminal dos

peptídeos catiônicos é uma região importante para a sua atividade biológica e a capacidade de permeabilidade celular, dessa forma, conjugações e modificações químicas nesta região podem levar a alterações de suas propriedades. (213)

Tabela 11 - Descrição dos componentes da série de Peptídeos Hecates que apresentaram inibição superior a 70%, com os seus respectivos nomes, grupamentos conjugados a cadeia principal do Hecate, pesos moleculares (em Dáton) e valores de IC_{50} (em micromolar).

Nome do composto	Grupamento conjugado	P.M. (Da)	IC_{50} (μ M)
Bz-Hecate	Benzil (N-terminal)	2.640,31	$5,62 \pm 0,2$
Hecate-K-(AG)	Lisina com Ácido gálico (C-terminal)	2.688,40	$17,03 \pm 0,2$
Acetil-Hecate	Acetil (N-terminal)	2.578,30	$2,14 \pm 0,02$
K-Hecate	Lisina (N-terminal)	2.664,50	$5,62 \pm 0,03$
Hecate	Sem conjugação	2.530,30	$8,27 \pm 0,1$

Fonte: Elaborada pela autora

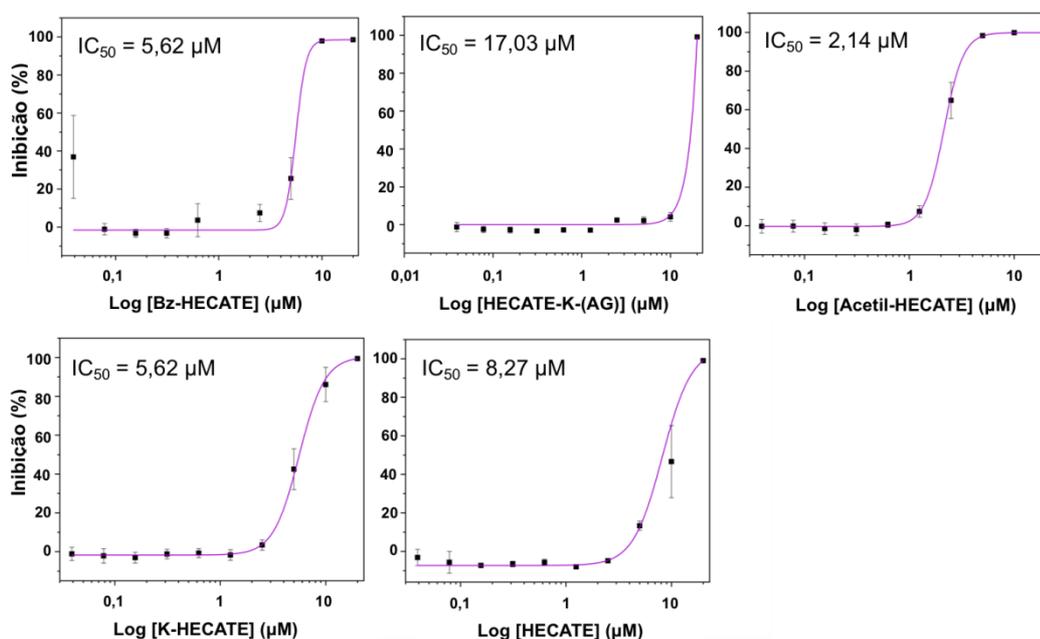


Figura 24 - Curvas de concentração-resposta para a série de Peptídeos sintéticos (série 1) e os valores de IC_{50} .

Fonte: Elaborada pela autora.

Na série de peptídeos avaliados na inibição da PLpro de SARS-CoV 2, o peptídeo Hecate não modificado, ou seja, sem a conjugação com outros grupamentos, foi capaz de inibir a atividade da enzima com IC_{50} de 8,27 μ M. Considerando esse peptídeo como referência da série e comparando esse valor com os outros peptídeos, a conjugação dos grupamentos Acetil, Benzil e a adição de um resíduo de lisina favoreceram as propriedades inibitórias, reduzindo os IC_{50} para 2,14 μ M, 5,62 μ M e 5,62 μ M, respectivamente.

No peptídeo que apresentou melhor resultado de inibição, o Acetil-Hecate ($IC_{50} = 2,14 \mu$ M), foi feita uma acetilação na região N-terminal. Em condições fisiológicas, a região N-

terminal dos peptídeos encontra-se positivamente carregada e ao adicionar o grupamento acetil, que é neutro, vai ocorrer uma neutralização parcial dessas cargas, reduzindo a carga total do sistema. Apesar da carga positiva favorecer os processos de permeabilidade devido a membrana celular ser carregada negativamente, a acetilação N-terminal gera uma maior estabilização do peptídeo, favorecendo as suas propriedades biológicas. (214)

De forma similar, para o peptídeo Bz-Hecate ($IC_{50} = 5,62 \mu M$), a adição do grupamento benzil na região N-terminal gerou uma melhora na inibição da PLpro quando comparada ao Hecate sem conjugação. A razão disso provavelmente pode ser a mesma que o Acetil-Hecate, ou seja, a adição do grupamento neutro embora tenha gerado a redução da carga positiva total, promoveu uma estabilização estrutural no peptídeo, o que favoreceu a sua atuação na inibição.

Outro resultado satisfatório foi obtido para o K-Hecate ($IC_{50} = 5,62 \mu M$) que apresenta conjugação com um resíduo adicional de lisina na região N-terminal. Nesse caso, a melhora na atividade comparada ao Hecate sem conjugação reside no fato de que a adição do resíduo de lisina reforça a carga positiva do peptídeo e isso favorece a sua atividade biológica. (213)

O peptídeo Hecate-K-(AG) também gerou inibição da atividade da PLpro, entretanto com uma $IC_{50} > 17,03 \mu M$, que foi uma concentração superior a obtida para o Hecate sem conjugação. Nesse caso, o grupamento ácido gálico foi adicionado na região C-terminal, preservando a região N-terminal do peptídeo. No mesmo ensaio, também foi avaliada a atividade do conjugado com o ácido gálico (GA-Hecate) na região N-terminal, porém este não gerou inibição da atividade da PLpro de SARS-CoV-2. Logo, a conjugação do Hecate com o ácido gálico na região C-terminal deixou a região N-terminal livre e com as cargas positivas mantidas, o que provavelmente favoreceu a atividade do peptídeo.

Apesar desse tipo de conjugação com ácido gálico já ter sido reportada, um estudo conduzido por Sanches e colaboradores (2015) mostrou que o Hecate teve a sua atividade lítica antitumoral reduzida quando conjugado com o ácido gálico (AG-Hecate). (209) Isso ocorreu pois a adição desse grupamento removeu a carga positiva da região N-terminal, o que diminuiu a atividade biológica. Além disso, também foi observado que a adição do ácido gálico gerou uma diminuição do conteúdo helicoidal do peptídeo, o que significa que gerou alterações estruturais que podem também ter influenciado em sua menor atividade neste caso, quando comparado ao Hecate sem conjugação. (209)

Portanto, pode-se concluir que nesta série de peptídeos avaliada, a conjugação do Hecate com os grupamentos benzil, a lisina adicional e principalmente o grupamento acetil, promoveram melhora na atividade inibitória do Hecate sem conjugação. Por serem peptídeos

que podem ser sintetizados em laboratório e com efeitos biológicos e de citotoxicidade já reportados, estes resultados abrem perspectivas para estudos celulares e em modelos animais que reforcem a utilização desses peptídeos no tratamento da infecção causada pelo SARS-CoV-2, bem como para outras infecções virais.

10.3.4 Peptídeos derivados da *Bothropstoxina-I*

A série de Peptídeos derivados da *Bothropstoxina-I* também foi obtida em colaboração com a Prof. Eduardo Maffud Cilli (Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara, Brasil) e é composta por 11 peptídeos sintéticos derivados da porção C-terminal da *Bothropstoxin-1*. Nesta série, todos os peptídeos testados (**Tabela 12**) causaram a inibição da PLpro de SARS-CoV-2 e foram avaliados no ensaio de concentração-resposta. As curvas obtidas neste ensaio, bem como os resultados de IC₅₀ obtidos para cada um dos peptídeos estão demonstrados na **Figura 25**.

Os peptídeos que compõe essa série são derivados da região C-terminal da *Bothropstoxin-1* (BthTX-I), que é uma miotoxina isolada do veneno de serpentes *Bothrops jararacussu* e que é homóloga a Fosfolipase A2 do tipo Lis49 (Lys49-PLA₂). Apesar dessa classe de toxinas não apresentar efeito catalítico, a região C-terminal da BthTX-I já foi reportada em relação as suas propriedades antimicrobianas. (215) Os peptídeos derivados desta região terminal, como o p-BthTX-I e seu dímero ligado por pontes dissulfeto já foram sintetizados e mostraram atividade antimicrobiana considerável contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e cepas multi resistentes. (215-216) O produto obtido da degradação sérica deste peptídeo, é unido por lisinas e que é denominado des-Lys12,Lys13-(p-BthTX-I)₂, demonstrou maior atividade antimicrobiana do que a sua forma dimérica ligada por pontes dissulfeto. (216) Além disso, também foi demonstrado que estes peptídeos não possuem efeito de toxicidade celular, o que torna vantajosa a expansão da investigação de seu potencial bioativo. (215-216) Adicionalmente, quando se pensa em produção em escala industrial, esses peptídeos apresentam-se vantajosos pois estão entre os menores peptídeos bioativos conhecidos, o que facilita a sua síntese e reduz os custos desse processo. (215)

Neste contexto, modificações nas sequências de aminoácidos desses peptídeos tem se mostrado como uma estratégia para potencializar os seus efeitos e propriedades biológicas. (217) Além das modificações diretamente na sequência, a utilização destes peptídeos na forma dimérica apresenta vantagens em relação a forma monomérica, como aumento da atividade antimicrobiana, solubilidade e resistência a degradação por proteases. (218-219)

Neste trabalho, foi avaliada a atividade inibitória na PLpro do dímero ligado por lisina des-Cys11,Lys12,Lys13-(pBthTX-I)₂K, aqui denominado de (pBthTX-I)₂K, e de seus derivados que compõem a série. O (pBthTX-I)₂K é o peptídeo de referência e apresentou atividade de inibição com IC₅₀ de 2,40 µM. Para esses ensaios, o peptídeo Hyalin a1 (Hy-a1), proveniente do veneno de sapos *Hypsiboas albopunctatus* (220), foi utilizado como um controle para investigar interações inespecíficas com a PLpro, pois este peptídeo apresentou baixa inibição da PLpro na concentração utilizada.

Tabela 12 - Descrição dos componentes da série de Peptídeos derivados da Bothropstoxina-I que apresentaram inibição superior a 70%, com os seus respectivos nomes, sequência de aminoácidos, pesos moleculares (em Dáton) e valores de IC₅₀ (em micromolar). Nas sequências, os destaques em vermelho representam as alterações que foi realizada em cada peptídeo. O peptídeo Hy-a1 foi utilizado como controle para investigar interações inespecíficas.

Nome	Sequência de aminoácidos	P.M. (Da)	IC ₅₀ (µM)
(pBthTX-I) ₂ K	(KKYRYHLKPF) ₂ K	2868	2.40 ± 0.1
A1	(A KYRYHLKPF) ₂ K	2754	3.50 ± 0.1
A2	(K A YRYHLKPF) ₂ K	2754	2.40 ± 0.03
A3	(KK A RYHLKPF) ₂ K	2684	1.00 ± 0.03
A4	(KKY A YHLKPF) ₂ K	2698	2.00 ± 0.03
A5	(KKYR A HLKPF) ₂ K	2684	1.90 ± 0.01
A6	(KKYRY A LKPF) ₂ K	2736	1.80 ± 0.07
A8	(KKYRYHL A PF) ₂ K	2754	2.40 ± 0.05
A10	(KKYRYHLKP A) ₂ K	2716	2.40 ± 0.2
A11	(KKYRYHLKPF) ₄ (K) ₂ K	5848	1.40 ± 0.02
A12	(KKYRYHLKPF) ₂ K(d-aa)	2868	1.30 ± 0.03
Hy-a1	IFGAILPLALGALKNLIK-NH ₂	1865	>10

Fonte: Elaborada pela autora.

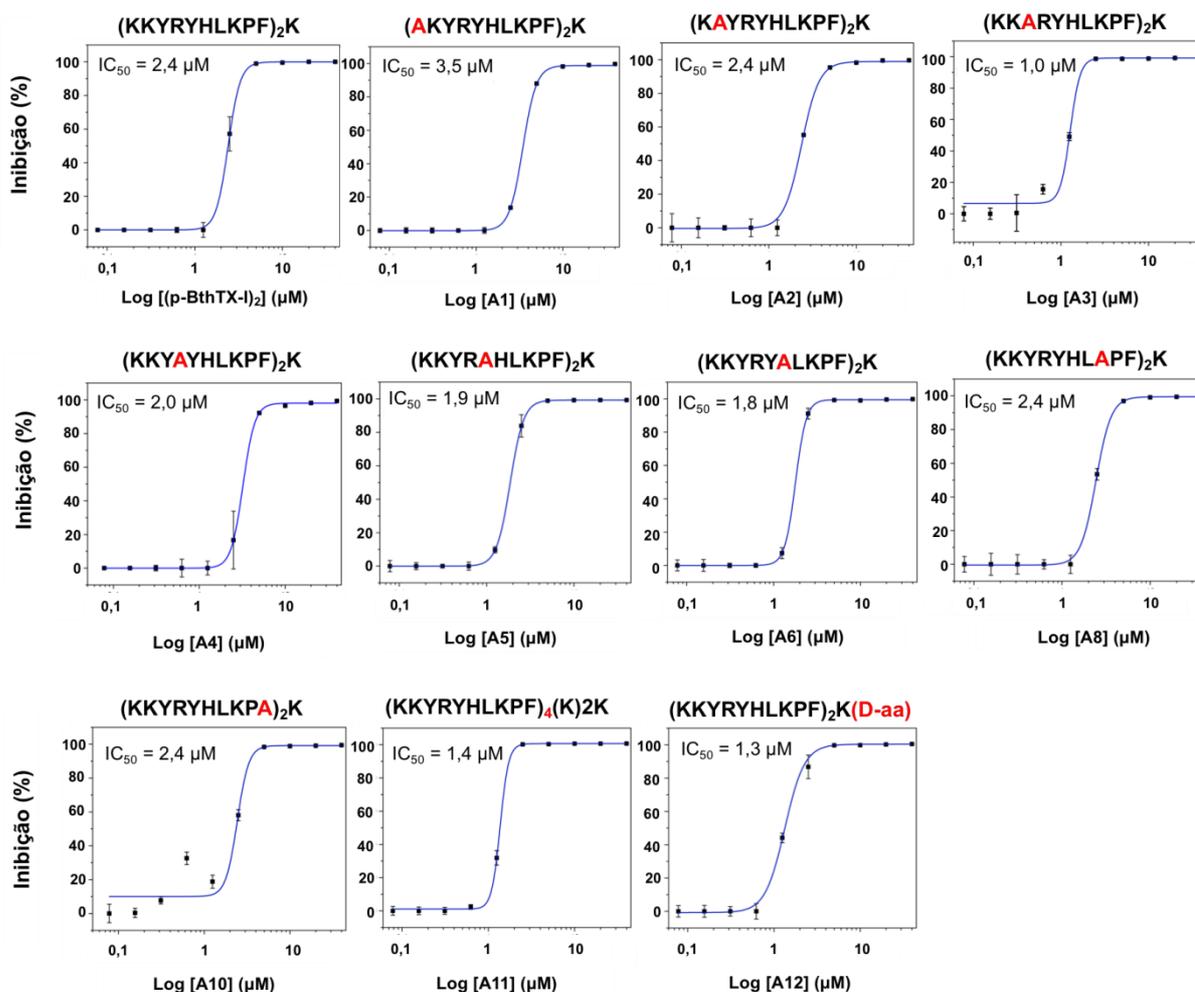


Figura 25 - Curvas de concentração-resposta para a série de Peptídeos sintéticos (série 2) e os valores de IC_{50} .
Fonte: Elaborada pela autora.

Para os compostos com substituições na sequência de aminoácidos, foi utilizado o aminoácido alanina pois é o aminoácido que possui isomeria ótica com a cadeia lateral mais simples (grupo metila, $-CH_3$), o que o torna uma substituição adequada em relação aos outros aminoácidos com cadeias laterais diferentes. Nos peptídeos A1, A2, A4, A6 e A8 foi feita a substituição de um resíduo positivo pelo resíduo de alanina, enquanto os peptídeos A3, A5 e A10 ocorreu a substituição de um resíduo aromático.

Dentre as substituições feitas, os peptídeos A3, A4, A5 e A6, apresentaram uma sutil melhora na inibição comparada ao $(pBthTX-I)_2K$, com os valores de IC_{50} de $1,0 \mu M$, $2,0 \mu M$, $1,9 \mu M$ e $1,8 \mu M$, respectivamente. Os peptídeos A2, A8 e A10 não apresentaram diferenças de inibição quando comparados ao peptídeo de referência. O peptídeo A1, no qual a modificação da substituição por alanina ocorreu na primeira lisina da sequência, o IC_{50} obtido foi de $3,5 \mu M$, superior ao do $(pBthTX-I)_2K$, sugerindo que essa modificação não potencializou a inibição.

Os compostos A11 e A12, não possuem substituição por alanina em suas sequências e apresentaram os valores mais baixos de IC_{50} , sendo $1,4 \mu M$ e $1,3 \mu M$, respectivamente. No A11, o peptídeo está em sua forma tetramérica, ou seja, organizado com a união de quatro unidades. Essa oligomerização favoreceu a sua atividade, gerando uma diminuição da sua concentração inibitória quando comparada a forma dimérica do (pBthTX-I)₂K. Já o A12, encontra-se na forma dimérica, entretanto a sua modificação é que os aminoácidos estão na configuração D, diferente dos demais peptídeos avaliados que possuem os aminoácidos na configuração L, que é a configuração comumente encontrada.

Portanto, apesar dessas diferenças observadas nos valores de IC_{50} , é possível considerar que toda a série do Peptídeos derivados da Bothropstoxina-I foi promissora para a inibição da atividade da PLpro e abriu perspectivas para mais estudos que serão comentados na próxima seção.

10.4 Continuidade dos estudos com a série de peptídeos derivados da Bothropstoxina-I

Dentre as séries de compostos avaliadas, foi dado o seguimento do estudo com a série dos Peptídeos derivados da Bothropstoxina-I, com a avaliação de seu efeito antiviral em células infectadas pelo vírus SARS-CoV-2. Esses estudos foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Lúcio H. G de Freitas Júnior (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil) e a metodologia e resultados detalhados estão descritos em detalhes no artigo publicado. (222)

De forma geral, os ensaios de triagem de alto conteúdo (HCS, do inglês *high-content screening*) foram desenvolvidos para testar o efeito de inibidores na infecção e citotoxicidade em células Vero infectadas com isolados clínicos de SARS-CoV-2. (221) O (pBthTX-I)₂K e os peptídeos análogos da série foram avaliados tanto em relação a atividade antiviral quanto para verificar se as modificações causariam alguma contribuição para a inibição viral, uma vez que no ensaio de inibição da PLpro as diferenças não foram expressivas.

Como resultados, todos os peptídeos da série apresentaram inibição da infecção viral variando de 4 a 70%, na concentração pontual de $100 \mu M$. Foram realizados os ensaios de concentração resposta para obter os valores de EC_{50} e foi observada uma similaridade na potencia inibitória do (pBthTX-I)₂K ($EC_{50} = 65 \mu M$), A8 ($EC_{50} = 67 \mu M$) e A11 ($EC_{50} = 51 \mu M$). O peptídeo A12, que é o D-isômero, apresentou atividade antiviral levemente aumentada dentro da série, com EC_{50} de $28 \mu M$. Os análogos peptídicos A1-6 e A10, apesar de terem apresentado atividade anti-SARS-CoV-2, os valores obtidos para o EC_{50} foram

superiores a 100 μM , o que demonstra menor potencia inibitória. Adicionalmente, a citotoxicidade também foi avaliada e apresentou-se baixa mesmo na maior concentração testada ($\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$), com exceção do peptídeo A11 (análogo tetramérico) que causou efeito citotóxico mesmo em baixas concentrações ($\text{CC}_{50} = 2 \mu\text{M}$). (222)

Além dos ensaios antivirais, esta série também foi analisada quanto a interação dos peptídeos com a PLpro, através de ensaios de MST. Esses experimentos foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido (Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil) e as afinidades das interações com esse alvo foram confirmadas, apresentando K_D que variaram entre 0,9 e 7 μM . (222) Adicionalmente, o mesmo grupo também contribuiu neste trabalho com o estudo computacional de *Docking* da PLpro com o peptídeo representativo da série. Assim, foi possível estabelecer o possível modo de ligação, indicando que o peptídeo posiciona-se no bolso catalítico da enzima, gerando um bloqueio ou oclusão na entrada do substrato específico da PLpro. (222)

Em resumo, esses resultados obtidos indicam que os peptídeos diméricos não tóxicos derivados da Bothropstoxina-I possuem atividades inibitórias celulares e enzimáticas atrativas, sugerindo assim que são protótipos promissores para o desenvolvimento de novas terapias baseadas em peptídeos contra a infecção por SARS-CoV-2.

11 CONCLUSÕES

Diante da atual situação de pandemia causada pelo SARS-CoV-2 e todo o impacto gerado por este vírus nos últimos dois anos, faz-se importante os esforços na busca por novas alternativas terapêuticas capazes de tratar esta infecção de forma efetiva. Considerando a protease PLpro como uma enzima importante para o processamento e replicação viral, esta é um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste capítulo, focado na PLpro, foi possível a obtenção da proteína purificada e ativa e foi realizada uma triagem de um total de 1265 compostos e peptídeos utilizando ensaios de inibição enzimática. Estes compostos e peptídeos foram provenientes de seis diferentes séries e do total, 26 moléculas foram capazes de causar uma inibição superior a 70% da atividade enzimática e foram avaliadas em ensaios de concentração-resposta.

Na série dos Inibidores de Protease (CrataBL, BbKI, BbCI e EcCI), os valores obtidos para IC_{50} variaram entre 0,69 a 5,77 μM . A avaliação da atividade destes inibidores em culturas celulares infectadas com o vírus já foram iniciadas em colaboração e encontram-se em andamento. Na série do *MMV Pandemic Response Box*, quatro compostos antimicrobianos (P-113D, Brilacidin e Tobramicina) e um antiviral (15C) apresentaram atividade inibitória, com IC_{50} na faixa de 1,64 a 14,79 μM . Já a série dos Peptídeos Hecate, o peptídeo de referência (o Hecate sem modificações) apresentou IC_{50} de 8,27 μM , enquanto os demais peptídeos que continham modificações químicas (Bz-Hecate, Acetil-Hecate, Hecate-K-(AG), K-Hecate) apresentaram inibição com IC_{50} variando entre 2,14 μM e 17,03 μM .

Por fim, a série dos Peptídeos derivados da Bothropstoxina-I, causaram inibição da atividade da PLpro com IC_{50} de 2,4 μM para o peptídeo dimérico (pBthTX-I)2K e os outros 10 peptídeos análogos modificados apresentaram IC_{50} entre 1,0 e 3,5 μM . Devido ao notório desempenho desta série, foi dada a continuidade com a realização dos ensaios celulares, resultando em até 70% da inibição da replicação do SARS-CoV-2 em células infectadas. Adicionalmente, ensaios de MST demonstraram que a interação entre a PLpro e esses peptídeos ocorre com K_D entre 0,9 e 7,0 μM e as análises de *docking* sugeriram que o modo de interação ocorre através da oclusão da região do sítio ativo.

Em resumo, este capítulo destaca a triagem experimental de compostos e peptídeos a inibidores da PLpro do vírus SARS-CoV-2 e a identificação de 26 moléculas com potencial inibitório nas faixas de nanomolar e micromolar. Essas moléculas são provenientes de compostos disponíveis no projeto CIBFar (CEPID da FAPESP) e provenientes de colaboradores externos. Sendo assim, os resultados apresentados neste capítulo contribuem

para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos tendo como alvo a PLpro e trazem perspectivas para os avanços nas estratégias para o tratamento da infecção causada pelo SARS-CoV-2.

12 ARTIGOS PUBLICADOS

Reporter Replicons for Antiviral Drug Discovery against Positive Single-Stranded RNA Viruses.**Ano:** 2020.**Autores:** Rafaela S. Fernandes, Marjorie C. L. C. Freire, Renata V. Bueno, Andre S. Godoy, Laura H. V. G. Gil, Glaucius Oliva.**Revista:** *Viruses* (fator de impacto 5,048).**DOI:** 10.3390/v12060598.***A Crystallographic Snapshot of SARS-CoV-2 Main Protease Maturation Process*****Ano:** 2021.**Autores:** G.D.Noske; A.M.Nakamura; V.O.Gawriljuk; R.S.Fernandes; G.M.A.Lima; H.V.D.Rosa; H.D.Pereira; A.C.M.Zeri; A.F.Z.Nascimento; M.C.L.C.Freire; D. Fearon; A.Douangamath; F.von Delft; G.Oliva; A.S.Godoy.**Revista:** *Journal of Molecular Biology* (fator de impacto 5,469).**DOI:** 10.1016/j.jmb.2021.167118.***Non-Toxic Dimeric Peptides Derived from the Bothropstoxin-I Are Potent SARS-CoV-2 and Papain-like Protease Inhibitors*****Ano:** 2021.**Autores:** Marjorie C. L. C. Freire; Gabriela D. Noske; Natália V. Bitencourt; Paulo R. S. Sanches; Norival A. Santos-Filho; Victor O. Gawriljuk; Eduardo P. de Souza; Victor H. R. Nogueira; Mariana O. de Godoy; Aline M. Nakamura; Rafaela S. Fernandes; Andre S. Godoy; Maria A. Juliano; Bianca M. Peres; Cecília G. Barbosa; Carolina B. Moraes; Lucio H. G. Freitas-Junior; Eduardo M. Cilli; Rafael V. C. Guido; Glaucius Oliva.**Revista:** *Molecules* (fator de impacto 4,412).**DOI:** 10.3390/molecules26164896.

Astaxanthin Delivery Systems for Skin Application: A Review

Ano: 2021

Autores: Sarah Giovanna Montenegro Lima; Marjorie Caroline Liberato Cavalcanti Freire; Verônica da Silva Oliveira; Carlo Solisio; Attilio Converti; Ádley Antonini Neves de Lima 1.

Revista: *Marine Drugs* (fator de impacto 5.118).

DOI: 10.3390/md19090511.

Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from Chikungunya virus and discovery of a novel ligand as a potential drug candidate

Ano: 2022.

Autores: Marjorie C. L. C. Freire; Luis G. M. Basso; Luis F. S. Mendes; Nathalya C. M. R. Mesquita; Melina Mottin; Rafaela S. Fernandes, Lucca R. Policastro; Andre S. Godoy; Igor A. Santos, Uriel E. A. Ruiz; Icaro P. Caruso, Bruna K. P. Sousa; Ana C. G. Jardim; Fabio C. L. Almeida; Laura H. V. G. Gil; Carolina H. Andrade; Glaucius Oliva.

Revista: *Scientific Reports* (fator de impacto 4.996).

DOI: 10.1038/s41598-022-14790-x.

REFERÊNCIAS

- 1 STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. **Viruses and human disease**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.
- 2 TANNOCK, G. A.; KIM, H.; XUE, L. Why are vaccines against many human viral diseases still unavailable; an historic perspective? **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 2, p. 129–138, 2020.
- 3 MAGDEN, J.; KÄÄRIÄINEN, L.; AHOLA, T. Inhibitors of virus replication: recent developments and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 612–21, 2005.
- 4 CHASTEL, C. Infections inapparentes chez l’Homme: un cheval de Troie pour l’introduction et la diffusion des arbovirus transmis par des moustiques dans les régions non endémiques? **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 104, n. 3, p. 213–219, 2011.
- 5 MARIMOUTOU, C. *et al.* Morbidity and impaired quality of life 30 months after chikungunya infection: comparative cohort of infected and uninfected french military policemen in reunion island. **Medicine**, v. 91, n. 4, p. 212–219, 2012.
- 6 GUO, Y. R. *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- an update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2020.
- 7 LI, Q. *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel Coronavirus–infected pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 199–207, 2020.
- 8 TREGONING, J. S. *et al.* Vaccines for COVID-19. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 202, n. 2, p. 162–192, 2020.
- 9 VASIREDDY, V. R.; MOHAN, G.; MALAYALA, S. V.; ATLURI, P. Review of COVID-19 variants and COVID-19 vaccine efficacy: what the clinician should know? **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 13, n. 6, p. 317, 2021.
- 10 TAO, K. *et al.* The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. **Nature Reviews Genetics**, v. 22, n.12, p.757–73, 2021
- 11 APAROY, P.; KUMAR, R. K.; REDDANNA, P. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5-LOX inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 3763–3778, 2012.
- 12 ACHARYA, C.; COOP, A. E.; POLLI, J.; MACKERELL, A. D. Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. **Current Computed Aided Drug Design**, v. 7, n. 1, p. 10–22, 2011.

13 HOLDGATE, G. *et al.* Biophysical methods in drug discovery from small molecule to pharmaceutical. *In*: WILLIAMS, M.; DAVITER, T. (ed.). **Protein-ligand interactions**. Totowa: Humana Press, 2013. p. 327–355.

14 GAO, K.; OERLEMANS, R.; GROVES, M. R. Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. **Biophysics Reviews**, v.12, n.1, p. 85–104, 2020.

15 RENAUD, J-P. *et al.* Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 10, p. 679–698, 2016.

16 ERLANSON, D.A.; FESIK, S.W.; HUBBARD, R.E.; JAHNKE, W.; JHOTI, H. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 9, p. 605–619, 2016.

17 KRIMM, I. Applications of ligand and protein-observed NMR in ligand discovery. *In*: HUDDLER, D.; ZARTLER, E. R. (ed.). **Applied biophysics for drug discovery**. New York: John Wiley & Sons, 2017. p. 175–195.

18 HOLDGATE, G.; EMBREY, K.; MILBRADT, A.; DAVIES, G. Biophysical methods in early drug discovery. **ADMET DMPK**, v. 7, n. 4, p. 222–241, 2019.

19 HUBER, S. *et al.* SPR-based fragment screening with neurotensin receptor 1 generates novel small molecule ligands. **PLoS One**, v.12, n. 5, 2017.

20 REN, C. *et al.* Quantitative determination of protein–ligand affinity by size exclusion chromatography directly coupled to high-resolution native mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 903–911, 2018.

21 KROEMER, R. T. Structure-based drug design: docking and scoring. **Current Protein & Peptide Science**, v. 8, n. 4, p. 312–328, 2007.

22 SERVICE, R.F. Protein structures for all. **Science**, v. 374, n. 6574, p. 1426–1427, 2021.

23 THORNTON, J. M.; LASKOWSKI, R. A.; BORKAKOTI, N. AlphaFold heralds a data-driven revolution in biology and medicine. **Nature Medicine**, v. 27, n. 10, p. 1666–1669, 2021.

24 FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies, **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 2015.

25 LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. general description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.

26 VAIRO, F.; HAIDER, N.; KOCK, R.; NTOUMI, F.; IPPOLITO, G.; ZUMLA, A. Chikungunya: epidemiology, pathogenesis, clinical features, management, and prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, p. 1003–1025, 2019.

- 27 SERGON, K. *et al.* Seroprevalence of chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 333–337, 2008.
- 28 CUNHA, M. S. *et al.* Chikungunya virus: an emergent arbovirus to the South American Continent and a continuous threat to the world. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1297, 2020.
- 29 SILVA, J. V. J. *et al.* A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Tropica**, v. 188, p. 213–214, 2018.
- 30 NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v.13, n. 1, p. 102, 2015.
- 31 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses. **Boletim Epidemiológico**, v. 53, n. 1, p. 1-36, 2022.
- 32 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 16 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, v. 53, n.16, p. 1-14, 2022.
- 33 SLAVOV, S. N. *et al.* Seroprevalence of Chikungunya virus in blood donors from Northern and Southeastern Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 4, p. 358–362, 2018.
- 34 ROLPH, M. S.; ZAID, A.; MAHALINGAM, S. Salivary transmission of the Chikungunya Arbovirus. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 86–87, 2016.
- 35 BANDEIRA, A. C. *et al.* Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: first report in Brazil. **IDCases**, v. 5, p. 57-59, 2016. DOI: 10.1016/j.idcr.2016.07.008.
- 36 TORRES, J. R. *et al.* Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 85–88, 2016. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.09.009.
- 37 CORRÊA T *et al.* Brain MR imaging of patients with perinatal Chikungunya virus infection. **American Journal of Neuroradiology**, v. 41, n. 1, p. 174–177, 2020.
- 38 LYRA P. *et al.* Congenital Chikungunya virus infection after an outbreak in Salvador, Bahia, Brazil. **American Journal of Perinatology Reports**, v. 6, n. 3, p. 299–300, 2016.
- 39 PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.
- 40 THIBERVILLE, S-D. *et al.* Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345–70, 2013.

- 41 THIBERVILLE S-D. *et al.* Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. 2004, 2013.
- 42 SIMON, F. *et al.* French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 7, p. 243–263, 2014.
- 43 SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- 44 POO, Y. S. *et al.* Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic Chikungunya virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 21, p. 254-257, 2014.
- 45 JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, Supl. 5, p. S471-S474, 2016.
- 46 GRIVARD, P. *et al.* Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Pathology Biology**, v. 55, n. 10, p. 490–494, 2007.
- 47 HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. **Insects**, v. 8, n. 1, p. 21, 2017.
- 48 RAUSALU, K. *et al.* Chikungunya virus infectivity, RNA replication and non-structural polyprotein processing depend on the nsP2 protease's active site cysteine residue. **Scientific Reports**, v. 15, p. 6, 2017. DOI: 10.1038/srep37124.
- 49 VOSS, J. E. *et al.* Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010.
- 50 MELTON, J. V. *et al.* Alphavirus 6K proteins form ion channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46923–46931, 2002.
- 51 FOX, J. M. *et al.* Broadly neutralizing alphavirus antibodies bind an epitope on E2 and inhibit entry and egress. **Cell**, v. 163, n. 5, p.1095–1107, 2015.
- 52 POWERS, A. M. Vaccine and therapeutic options to control chikungunya virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. e00104, 2017.
- 53 LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, p. 165–74, 2015. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.06.009.
- 54 RUPP, J. C.; SOKOLOSKI, K. J.; GEBHART, N. N.; HARDY, R. W. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483–500, 2015.

- 55 RASHAD, A. A.; MAHALINGAM, S.; KELLER, P. A. Chikungunya virus: emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1147–1166, 2014.
- 56 BAKAR, F. A.; NG, L. F. P. Nonstructural proteins of alphavirus—potential targets for drug development. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 71, 2018.
- 57 ZHANG, R. *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 2018.
- 58 CHOI, K. H. Viral polymerases. *In*: ROSSMANN, M.; RAO, V. (ed.). **Viral molecular machines**. Boston: Springer, 2011. p. 267–304.
- 59 LELLO, L. S. *et al.* nsP4 is a major determinant of alphavirus replicase activity and template selectivity. **Journal of Virology**, v. 95, n. 20, p. e00355, 2021.
- 60 THIBOUTOT, M. M. *et al.* Chikungunya: a potentially emerging epidemic? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. e623, 2010.
- 61 PIETILÄ, M. K.; HELLSTRÖM, K.; AHOLA, T. Alphavirus polymerase and RNA replication. **Virus Research**, v. 234, p. 44–57 2017. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.01.007.
- 62 TAN, Y. B. *et al.* Crystal structures of alphavirus nonstructural protein 4 (nsP4) reveal an intrinsically dynamic RNA-dependent RNA polymerase fold. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 2, p. 1000–1016, 2022.
- 63 JUMPER J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.
- 64 MINKYUNG, B. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**, v. 373, n. 6557, p. 871–876, 2021.
- 65 ASLANIDIS, C.; JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 20, p. 6069–6074, 1990.
- 66 NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 2007.
- 67 WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 668-673, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh371.
- 68 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical Biochemistry**, v. 209, n. 1, p. 32–44, 1993.
- 69 PROVENCHER, S.W.; GLOECKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. **Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 33–7, 1981.

70 SREERAMA, N.; WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 2002.

71 LEES, J. G.; MILES, A. J.; WIEN, F.; WALLACE, B. A. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. **Bioinformatics**, v. 22, n. 16, p. 1955–1962, 2006.

72 MAO, D.; WACHTER, E.; WALLACE, B. A. Folding of the mitochondrial proton adenosine triphosphatase proteolipid channel in phospholipid vesicles. **Biochemistry**, v. 21, n. 20, p. 4960–4968, 1982.

73 KO, J.; PARK, H.; HEO, L.; SEOK, C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W294–W297, 2012.

74 JURRUS, E. *et al.* Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Sciences**, v. 27, n. 1, p. 112–28, 2018.

75 ASHKENAZY, H. *et al.* ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W344–W350, 2016.

76 THE PYMOL molecular graphics system, version 1.8. New York: Schrödinger LLC, 2015.

77 SANTOS, K. B. *et al.* Highly flexible ligand docking: benchmarking of the DockThor program on the LEADS-PEP protein–peptide data set. **Journal of Chemical Information and Modelling**, v. 60, n. 2, p. 667–683, 2020.

78 GUEDES, I. A. *et al.* New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3198, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-82410-1.

79 SCHRÖDINGER Release 2015-2: protein preparation Wizard. New York: Schrödinger, LLC, 2015.

80 SCHRÖDINGER Release 2015-2: ligprep. New York: Schrödinger, LLC, 2015.

81 SALENTIN, S. *et al.* PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W443–W447, 2015.

82 STIERAND, K.; MAAß, P. C.; RAREY, M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. **Bioinformatics**, v. 22, n. 14, p. 1710–1716, 2006.

83 FRICKER, P. C.; GASTREICH, M.; RAREY, M. Automated drawing of structural molecular formulas under constraints. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v. 44, n. 3, p. 1065–78, 2004.

84 HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

- 85 MALDE, A. K. *et al.* An automated force field Topology Builder (ATB) and repository: version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 12, p. 4026–37, 2011.
- 86 ABRAHAM M. J. *et al.* Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, n. 2, p. 19–25, 2015.
- 87 SCHMID, N. *et al.* Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 7, p. 843–856, 2011.
- 88 BERENDSEN, H. J. C. *et al.* Interaction models for water in relation to protein hydration. In: PULLMAN, B. (ed.). **Intermolecular forces**. Dordrecht: Springer, 1981. p. 331–342.
- 89 ESSMANN, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. **Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995.
- 90 OLIVEIRA, D. M. *et al.* Organometallic complex strongly impairs chikungunya virus entry to the host cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-12, 2020.
- 91 SANTOS, I. A. *et al.* Chikungunya virus entry is strongly inhibited by phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.
- 92 FERNANDES, R. S. *et al.* Discovery of an imidazonaphthyridine and a riminophenazine as potent anti-Zika virus agents through a replicon-based high-throughput screening. **Virus Research**, v. 299, p. 198388, 2021. DOI: 10.1016/j.virusres.2021.198388
- 93 LI, J. Q. *et al.* Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for screening inhibitors of Zika virus. **Antiviral Research**, v. 150, p. 148–154, 2018. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.12.017.
- 94 REINHARD, L. *et al.* Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. **Acta Crystallographica Section F**, v. 69, n. 2, p. 209–214, 2013.
- 95 ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. The stabilization of proteins by osmolytes. **Biophysical Journal**, v. 47, n. 3, p. 411–414, 1985.
- 96 STREET, T. O.; BOLEN, D. W.; ROSE, G. D. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 38, p. 13997–14002, 2006.
- 97 TIMASHEFF, S. N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. **Advances in Protein Chemistry**, v. 51, p. 355–432, 1998. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60656-7.
- 98 BOLEN, D. W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, n. 5, p. 955–963, 2001.
- 99 FONSECA, L. C. *et al.* Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 543–548, 2006.

100 HUGHES, C. S. *et al.* Quality control and biophysical characterisation data of VanSA. **Data in Brief**, v. 14, p. 41–47, 2017. DOI: 10.1016/j.dib.2017.07.012.

101 SOME, D. *et al.* Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS). **Journal of Visualized Experiments**, v. 148, p. e59615, 2018. DOI: 10.3791/59615.

102 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2007.

103 JOHNSON, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. **Proteins Structure Functions and Bioinformatics**, v. 35, n. 3, p. 307–312, 1999.

104 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 243–251, 2000.

105 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2007.

106 KHECHINASHVILI, N. N.; JANIN, J.; RODIER, F. Thermodynamics of the temperature-induced unfolding of globular proteins. **Protein Sciences**, v. 4, n. 7, p. 1315–1324, 1995.

107 GREENFIELD, N. J. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2733–2741, 2007.

108 NARAYAN, A.; BHATTACHARJEE, K.; NAGANATHAN, A. N. Thermally versus chemically denatured protein states. **Biochemistry**, v. 58, n. 21, p. 2519–23, 2019.

109 CHAKRABARTTY, A. *et al.* Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. **Biochemistry**, v. 32, n. 21, p. 5560–5565, 1993.

110 TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 95, 1970.

111 WALLQVIST, A.; COVELL, D. G.; THIRUMALAI, D. Hydrophobic interactions in aqueous urea solutions with implications for the mechanism of protein denaturation. **Journal of American Chemical Society**, v. 120, n. 2, p. 427–428, 1998.

112 GRIKO, Y. *et al.* Thermal and urea-induced unfolding in T7 RNA polymerase: calorimetry, circular dichroism and fluorescence study. **Protein Sciences**, v. 10, n. 4, p. 845–853, 2001.

113 DUROWOJU, I. B. *et al.* Differential scanning calorimetry — a method for assessing the thermal stability and conformation of protein antigen. **Journal of Visualized Experiments**, v. 121, p. 55262, 2017. DOI: 10.3791/55262.

- 114 JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 531, n. 2, p. 100–109, 2013.
- 115 KARANTZENI, I. *et al.* Comparative thermal denaturation of *Thermus aquaticus* and *Escherichia coli* type 1 DNA polymerases. **Biochemical Journal**, v. 374, n. 3, p. 785–792, 2003.
- 116 SANCHEZ-RUIZ, J. M. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1648–1652, 1988.
- 117 LYUBAREV, A.; KURGANOV, B. Analysis of DSC data relating to proteins undergoing irreversible thermal denaturation. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 62, n. 1, p. 51–62, 2000.
- 118 SCOTT, D. E.; SPRY, C.; ABELL, C. Differential scanning fluorimetry as part of a biophysical screening cascade. *In*: DEGISCHER, H.-P. **Fragment drug discovery lessons**. Weinheim: Wiley-VCH, 2016. p.139–172.
- 119 EKINS, S.; PERRYMAN, A. L.; HORTA ANDRADE, C. OpenZika: an IBM world community grid project to accelerate Zika virus drug discovery. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005023, 2016.
- 120 MOTTIN M. *et al.* The A–Z of Zika drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 11, p. 1833–1847, 2018.
- 121 EKINS, S. *et al.* Open drug discovery for the Zika virus. **F1000Research**, v. 5, p. 150, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.8013.1.
- 122 JERABEK-WILLEMSEN, M. *et al.* Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 342–453, 2011.
- 123 LINKE, P. *et al.* An automated microscale thermophoresis screening approach for fragment-based lead discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 21, n. 4, p. 414–421, 2016.
- 124 JUNG, H. *et al.* Ludwig-Soret effect in a linear temperature field: theory and experiments for steady state distributions. **Physics Letters A: general, atomic and solid state physics**, v. 375, n. 19, p. 1917–1920, 2011.
- 125 RAINARD, J. M.; PANDARAKALAM, G. C.; MCELROY, S. P. Using microscale thermophoresis to characterize hits from high-throughput screening: a european lead factory perspective. **SLAS Discovery**, v. 23, n. 3, p. 225–241, 2018.
- 126 WILLIAMSON, M. P. Chemical shift perturbation. *In*: WEBB, G. (ed.). **Modern magnetic resonance**. Cham: Springer, p. 995–1012, 2018.
- 127 WILLIAMSON, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 73, p.1–16, 2013. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2013.02.001.

- 128 ANDRICOPULO, A.; GUIDO, R.; OLIVA, G. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008;
- 129 MARIANI, V. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2722–2728, 2013.
- 130 TUNYASUVUNAKOOL, K. *et al.* Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 590–596, 2021.
- 131 HILLEN, H. S. *et al.* Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. **Nature**, v. 584, n. 7819, p. 154–156, 2020.
- 132 SATHYAPRIYA, R.; VISHVESHWARA, S. Interaction of DNA with clusters of amino acids in proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 32, p. 4109–4118, 2004.
- 133 MENG, X. Y. *et al.* Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computational Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–57, 2011.
- 134 ŚLEDŹ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 48, p. 93–102, 2018. DOI: 10.1016/j.sbi.2017.10.010.
- 135 ZHAO, H.; CAFLISCH, A. Molecular dynamics in drug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 91, p. 4–14, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.08.004
- 136 FENG, Z. *et al.* Structural insight into tetrameric hTRPV1 from homology modeling, molecular docking, molecular dynamics simulation, virtual screening, and bioassay validations. **Journal of Chemical Information and Modelling**, v. 55, n. 3, p. 572–588, 2015.
- 137 RUBACH, J. K. *et al.* Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. **Virology**, v. 384, n. 1, p. 201–208, 2009.
- 138 TOMAR, S. *et al.* Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. **Journal of Virology**, v. 80, n. 20, p. 9962–9969, 2006.
- 139 THAL, M. A. *et al.* Template requirements for recognition and copying by Sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase. **Virology**, v. 358, n. 1, p. 221–232, 2007.
- 140 CHEN, M. W. *et al.* Chikungunya virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase core domain displays detergent-sensitive primer extension and terminal adenylyltransferase activities. **Antiviral Research**, v. 143, p. 38–47, 2017. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.04.001.
- 141 FERNANDES, R. S. *et al.* Reporter replicons for antiviral drug discovery against positive single-stranded RNA viruses. **Viruses**, v. 12, n. 6, p. 598, 2020.
- 142 KÜMMERER, B. M. Establishment and application of flavivirus replicons. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1062, p. 165-173, 2018. DOI: 10.1007/978-981-10-8727-1_12.

- 143 POHJALA, L. *et al.* Inhibitors of Alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. **PLoS One**, v. 6, n.12, p. e28923, 2011.
- 144 VARGHESE, F. S. *et al.* Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. **Antiviral Research**, v. 126, p. 117–124, 2016. DOI: 10.1007/978-981-10-8727-1_12.
- 145 LANI, R. *et al.* Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11421, 2015.
- 146 LANI, R. *et al.* Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 133, p. 50–61, 2016. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.07.009.
- 147 ALBULESCU, I. C. *et al.* Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. **Antiviral Research**, v. 121, p. 39–46, 2015. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.06.013.
- 148 EASTMAN, A. Improving anticancer drug development begins with cell culture: misinformation perpetrated by the misuse of cytotoxicity assays. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8854, 2017.
- 149 SANTOS, I. A. *et al.* Repurposing potential of rimantadine hydrochloride and development of a promising platinum (II)-rimantadine metallodrug for the treatment of Chikungunya virus infection. **Acta Tropica**, v. 227, p. 106300, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2021.106300
- 150 PEREIRA, A. K. *et al.* Memantine hydrochloride: a drug to be repurposed against Chikungunya virus? **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 3, p. 954–961, 2021.
- 151 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus disease (COVID-19) dashboard**. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 02 jun. 2022.
- 152 CHAN, J. F. W. *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes Infection**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 2020.
- 153 ZHANG, T.; WU, Q.; ZHANG, Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. **Current Biology**, v. 30, n. 7, p. 1346–1351, 2020.
- 154 CASCELLA, M. *et al.* **Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19)**. 2022. Disponível em: https://alatorax.org/es/descargar/adjunto/417_dYgnEK_20marzo2020.pdf. Acesso em: 02 jun. 2022.
- 155 KORBER, B. *et al.* Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. **Cell**, v. 182, n. 4, p. 812–827, 2020.
- 156 COLLIE, S. *et al.* Effectiveness of BNT162b2 vaccine against omicron variant in South Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 5, p. 494–496, 2022.

157 AHMAD, F. B. *et al.* Provisional mortality data—united states, 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 14, p. 519, 2021.

158 WANG, M. Y. *et al.* SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 724, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.587269

159 TAY, M. Z. *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2019.

160 PEIRIS, J. S. M. *et al.* Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. **Lancet**, v. 361, n. 9371, p. 1767–1772, 2003.

161 HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

162 WANG, D. *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. **Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 2020.

163 WU, X. *et al.* Diagnostic techniques for COVID-19: a mini-review. **Journal of Virological Methods**, v. 301, p. 14437, 2022. DOI: 10.1016/j.jviromet.2021.114437

164 VERMA, N.; PATEL, D.; PANDYA, A. Emerging diagnostic tools for detection of COVID-19 and perspective. **Biomedical Microdevices**, v. 22, n. 4, p. 1–18, 2020.

165 XIANG, F. *et al.* Antibody detection and dynamic characteristics in patients with coronavirus disease 2019. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 8, 1930–1934, 2020.

166 JAYK, B. A. *et al.* Molnupiravir for oral treatment of Covid-19 in nonhospitalized patients. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 6, p. 509–520, 2022.

167 MAHASE, E. Covid-19: Pfizer’s paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. **British Medical Journal**, v. 375, n. 2713, p. 375, 2021.

168 GOTTLIEB, R. L. *et al.* Early remdesivir to prevent progression to severe Covid-19 in outpatients. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 4, p. 305–315, 2022.

169 GOTTLIEB, R. L. *et al.* Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 325, n. 7, p. 632–644, 2021.

170 WEINREICH D, M. *et al.* REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 3, p. 238–251, 2021.

171 GROUP, R. C. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 8, p. 693–704, 2021.

- 172 KALIL, A. C. *et al.* Baricitinib plus remdesivir for hospitalized adults with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 9, p. 795–807, 2021.
- 173 GORDON, A. C. *et al.* Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 16, p. 1491-1502, 2021.
- 174 CERQUEIRA-SILVA, T. *et al.* Effectiveness of CoronaVac, ChAdOx1, BNT162b2 and Ad26. COV2. S among individuals with prior SARS-CoV-2 infection in Brazil. **Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 791-801, 2022.
- 175 DÖMLING, A.; GAO, L. Chemistry and biology of SARS-CoV-2. **Chem**, v. 6, n. 6, p. 1283–1295, 2020.
- 176 WALLS, A. C. *et al.* Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292, 2020.
- 177 ASTUTI, I. Severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): an overview of viral structure and host response. **Diabetes Metabolic Syndrome Clinical Research Reviews**, v. 14, n. 4, p. 407–412, 2020.
- 178 BRANT, A. C. *et al.* SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. **Cell Biosciences**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2021.
- 179 KLEMM, T. *et al.* Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. **EMBO Journal**, v. 39, n. 18, p. 106275, 2020.
- 180 ARYA, R. *et al.* Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 2, p. 166725, 2021.
- 181 HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280, 2020.
- 182 HARTENIAN, E. *et al.* The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, 2020.
- 183 HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280, 2020.
- 184 KLEIN, S. *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2020.
- 185 BÁEZ-SANTOS, Y. M.; JOHN, S. E. S.; MESECAR, A. D. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. **Antiviral Research**, v. 115, p. 21–38, 2015. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.12.015
- 186 GAO, X. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 1, p. 237–245, 2020.
- 187 HAN, Y. S. *et al.* Papain-like protease 2 (PLP2) from severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV): expression, purification, characterization, and inhibition. **Biochemistry**, v. 44, n. 30, p.10349–10359, 2005.

- 188 RUT, W. *et al.* Activity profiling and structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2-PLpro protease provides a framework for anti-COVID-19 drug design. **Science Advances**, v. 6, n. 42, p. eabd4596, 2020.
- 189 SHIN, D. *et al.* Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. **Nature**, v. 587, n. 7835, p. 657–662, 2020.
- 190 FERREIRA, R. S. *et al.* Crystal structure of Crataeva tapia Bark protein (CrataBL) and its effect in human prostate cancer cell lines. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e64426, 2013.
- 191 ARAÚJO, R. M. S. *et al.* A new exogen anticoagulant with high selectivity to intrinsic pathway of coagulation. **Thrombosis Research**, v. 128, n. 4, p. 395–397, 2011.
- 192 ARAÚJO, R. M. S. *et al.* Lectin from Crataeva tapia bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 1, n. 2, p. 97–100, 2011.
- 193 ARAÚJO, R. M. S. *et al.* Crataeva tapia bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20–26, 2012. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.10.018
- 194 HANSEN, D. *et al.* Crystal structure of a novel cysteinless plant Kunitz-type protease inhibitor. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, v. 360, n. 4, p. 735–740, 2007.
- 195 ARAÚJO, A. P. U. *et al.* Kunitz-type Bauhinia bauhinioides inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of the cDNAs, heterologous expression and structural studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 386, n. 6, p. 561–568, 2005.
- 196 ALMEIDA-REIS, R. *et al.* Plant proteinase inhibitor BbCI modulates lung inflammatory responses and mechanic and remodeling alterations induced by elastase in Mice. **BioMed Research International**, v. 2017, n. 8287125, 2017. DOI: 10.1155/2017/8287125
- 197 OLIVA, M. L. V. *et al.* Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: a mini review. **Current Protein and Peptide Sciences**, v. 12, n. 5, p. 348–257, 2011.
- 198 OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, M. U. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 615–621, 2008.
- 199 NAKAHATA, A. M. *et al.* Blocking the proliferation of human tumor cell lines by peptidase inhibitors from bauhinia seeds. **Planta Medica**, v. 79, n. 3–4, p. 227–235, 2013.
- 200 BRITO, M. V. *et al.* The Kallikrein inhibitor from bauhinia bauhinioides (BbKI) shows antithrombotic properties in venous and arterial thrombosis models. **Thrombosis Research**, v. 133, n. 5, p. 945–951, 2014.

- 201 NAKAHATA, A. M. *et al.* The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 392, n. 4, p. 327–336, 2011.
- 202 ZHOU, D. *et al.* Crystal structures of a plant trypsin inhibitor from *enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of its complex with bovine trypsin. Kobe B, editor. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e62252, 2013.
- 203 GHOSH, A. K. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like novel protease inhibitors: design, synthesis, protein-ligand X-ray structure and biological evaluation. **Journal of Medical Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 4968–4979, 2010.
- 204 GIACOMETTI, A. *et al.* In vitro activity of the histatin derivative P-113 against multidrug-resistant pathogens responsible for pneumonia in immunocompromised patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1249–1252, 2005.
- 205 CIRIONI, O. *et al.* Potential therapeutic role of histatin derivative P-113 in experimental rat models of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 2, p. 356–564, 2004.
- 206 MENSA, B. *et al.* Comparative mechanistic studies of brilacidin, daptomycin, and the antimicrobial peptide LL16. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5136–5145, 2014.
- 207 BAKOVIC, A. *et al.* Brilacidin demonstrates inhibition of SARS-CoV-2 in cell culture. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 271, 2021.
- 208 CAGINI, C. *et al.* The role of ozonized oil and a combination of tobramycin/dexamethasone eye drops in the treatment of viral conjunctivitis: a randomized clinical trial. **International Ophthalmology**, v. 40, n. 12, p. 3209–3215. 2020.
- 209 SANCHES, P. R. S. *et al.* A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. **Amino Acids**, v. 47, n. 7, p. 1433–43, 2015.
- 210 RIVERO-MÜLLER, A. *et al.* Use of hecate–chorionic gonadotropin β conjugate in therapy of lutenizing hormone receptor expressing gonadal somatic cell tumors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 269, n. 1–2, p. 17–25, 2007.
- 211 HANSEL, W. *et al.* Targeted destruction of prostate cancer cells and xenografts by lytic peptide-betaLH conjugates. **Reproductive Biology**, v. 1, n. 1, p. 20–32, 2001.
- 212 LEUSCHNER, C. *et al.* Membrane disrupting lytic peptide conjugates destroy hormone dependent and independent breast cancer cells in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 78, n. 1, p. 17–27, 2003.
- 213 CILLI, E. M. *et al.* Correlations between differences in amino-terminal sequences and different hemolytic activity of sticholysins. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1201–1204, 2007.
- 214 LINSTER, E.; WIRTZ, M. N-terminal acetylation: an essential protein modification emerges as an important regulator of stress responses. **Journal of Experimental Botany**, v.

69, n. 19, p. 4555–4568, 2018.

215 SANTOS-FILHO, N. A. *et al.* Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. **Toxicon**, v. 103, p. 160–168, 2015. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.07.004

216 SANTOS-FILHO, N. A. *et al.* Antibacterial activity of the non-cytotoxic peptide (p-BthTX-I) 2 and its serum degradation product against multidrug-resistant bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1898, 2017.

217 LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A2 homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 28, p. 3224–3230, 2010.

218 LIU, G.; SHANG, Y.; YU, Y. Induced endoplasmic reticulum (ER) stress and binding of over-expressed ER specific chaperone GRP78/BiP with dimerized epidermal growth factor receptor in mammalian cells exposed to low concentration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Mutation Research**, v. 596, n. 1-2, p. 12–21, 2006.

219 FALCIANI, C. *et al.* Molecular basis of branched peptides resistance to enzyme proteolysis. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 69, n. 3, p. 216–221, 2007.

220 ALVES, E. *et al.* Micelle Bound structure and model membrane interaction studies of the peptide hylin a1 from the arboreal south American Frog *Hypsiboas albopunctatus*. **Protein & Peptide Letters**, v. 22, n. 8, p. 719–726, 2015.

221 SALES-MEDINA, D. F. *et al.* Discovery of clinically approved drugs capable of inhibiting SARS-CoV-2 in vitro infection using a phenotypic screening strategy and network-analysis to predict their potential to treat covid-19. **BioRxiv**, 2020. DOI: 10.1101/2020.07.09.196337.

222 FREIRE, M. C. L. C. *et al.* Non-toxic dimeric peptides derived from the bothropstoxin-I are potent SARS-CoV-2 and papain-like protease inhibitors. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4896, 2021.