



PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS ANTIVIRAIS CONTRA FEBRE DENGUE

Samara Bossa Aleixo (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Flavio Augusto Vicente Seixas (Orientador), e-mail: favseixas@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: 21000000 Farmacologia, 21005001 Farmacologia Bioquímica e Molecular

Palavras-chave: Dengue vírus, varredura virtual, *docking*

Resumo:

A febre Dengue é uma doença sem tratamento específico nem vacinas disponíveis. Assim, este estudo tem por objetivo utilizar a estrutura 3D da protease NS3 do vírus Dengue como alvo em simulações de varredura virtual, montar uma biblioteca com moléculas de produtos naturais e identificar, pelo menos, uma molécula que possa ser adquirida e testada *in vitro*. A estrutura da proteína alvo ligada ao inibidor (BEZ)(NLE)KR(OAR) foi obtida na base PDB para simulações computacionais. A estrutura foi minimizada por dinâmica molecular e depois utilizada em simulações de *redocking*. O programa escolhido foi o *Vina*, que foi capaz de recuperar a pose cristalográfica do ligante com escore médio de -9,0. A biblioteca de produtos naturais com disponibilidade comercial da base de dados *Zinc*, contendo 174.000 moléculas, foi obtida e avaliada conforme protocolo validado. Os compostos melhores ranqueados que o ligante de referência foram novamente avaliados por outras cinco varreduras. Apenas cinco compostos apresentaram reproduzibilidade nas repetições e foram aprovados pelos critérios *ADMETox*. O composto Zinc77256922, com escore médio de -9,9, foi escolhido por ter alta probabilidade de se ligar à enzima viral e baixa probabilidade de produzir efeitos tóxicos em células de mamíferos.

Introdução

A febre Dengue é uma doença tropical provocada por um vírus do mesmo nome (DENV), o qual tem causado grandes epidemias no Brasil nas últimas décadas (CAMARA et al, 2007). Ainda não existem vacinas nem tratamento farmacológico específico contra esta flavovirose, o que tem despertado o interesse de pesquisadores em descobrir novas moléculas capazes de controlar a evolução da doença. Dentre os alvos pesquisados, está o complexo proteico NS2B-NS3, composto por um cofator de ativação (NS2B) e pela proteína NS3 com tripla atividade: serina protease, NTPase e RNA helicase. Estudos sobre as proteínas NS2B e NS3 dos flavivírus já têm sido realizados, a exemplo do estudo feito por Pambudi et al. (2013), que identificou um composto chamado SK-12, o qual inibiu eficientemente os

quatro sorotipos de DENV com EC₅₀ de 0,4-4,92 µM, provando que pode ser um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos contra DENV. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar a estrutura 3D da proteína NS2B-NS3 do DENV como alvo em simulações de varredura virtual e identificar, pelo menos, uma molécula que possa ser adquirida para testes *in vitro*.

Materiais e métodos

A proteína NS3 (protease) ligada a um peptídeo inibidor foi obtida na base de dados *Protein Data Bank* (PDB), com código de identificação 3u1i (NOBLE et al, 2012). Métodos de simulações computacionais por dinâmica molecular foram aplicados à estrutura da proteína alvo para maximizar sua interação com o ligante. Para isso, as coordenadas estruturais foram minimizadas pelo método de gradiente conjugado até convergência do sistema. As simulações foram realizadas em uma caixa periódica contendo água TIP3 e 0,1M NaCl, pH 7,0, temperatura de 300K e 1 atm de pressão, utilizando o campo de força *Charmm c35b2_c36a2*, por meio do programa NAMD2.

As simulações de *docking* e varredura virtual foram realizadas nos programas *AutoDock*, *Vina* e *Molegro* para identificar o mais adequado para o sistema em uso. Foram avaliadas a biblioteca de produtos naturais da base de dados *Zinc*, mais a estrutura do ligante cristalográfico (BEZ)(NLE)KR(OAR) definido como padrão para comparação e referência. Só os compostos melhores classificados que o inibidor de referência foram considerados. Para evitar resultados falso-positivos, foram realizadas cinco novas varreduras com os compostos melhores classificados. Os melhores candidatos foram selecionados, levando em consideração o mais baixo valor de *rmsd*, bem como o melhor escore do programa.

Os compostos selecionados pela varredura virtual foram filtrados pelos critérios *ADME/tox*, por meio do programa *Osiris Property Explorer*, que leva em consideração, além dos parâmetros das regras de Lipinski, outros que avaliam a carcinogenicidade, mutagenicidade e toxicidade aguda dos compostos.

Resultados e Discussão

No *Protein Data Bank*, foi escolhida a estrutura NSB2-NS3 protease de Dengue vírus ligada ao peptídeo modificado (BEZ)(NLE)KR(OAR), código de identificação 3u1i com 2,3 Å de resolução. A unidade assimétrica da estrutura era formada por duas enzimas ligadas ao peptídeo inibidor (cadeias A, B, C, D, E e F). A sobreposição das duas enzimas mostrou divergências no ancoramento do ligante. Então, as coordenadas foram editadas de modo que apenas uma unidade biológica fosse utilizada, sendo escolhida aquela com maior número de interações com o ligante (cadeias C, D e E).

A estrutura foi minimizada por dinâmica molecular e depois utilizada em simulações de *redocking*, e apenas o programa *Vina* foi capaz de reproduzir a pose da estrutura cristalográfica do ligante. Nos parâmetros do programa, a caixa de busca tinha dimensões de 20, 18 e 20, centradas nas coordenadas 36, -42 e 46 nos eixos x, y e z, respectivamente. O escore

obtido foi de -9,0, que também serviu como nota de corte, e a raiz quadrada média da distância (rmsd) encontrada foi de 1,36 Å. Considerando que a literatura recomenda uma por volta de 2,0 Å, o resultado obtido foi satisfatório.

Os compostos da biblioteca de produtos naturais obtidos da base de dados Zinc foram transformados em coordenadas 3D, e neles adicionados hidrogênios em pH 7,0 por meio do programa *OpenBabel*. A biblioteca foi dividida em 174 arquivos com 1.000 moléculas cada, mais o ligante de referência, para servir como nota de corte. Selecionados os melhores compostos, foram realizadas cinco varreduras com os mesmos para evitar falsos-positivos, cujos resultados são mostrados na tabela 1.

Tabela 01. Escore médio dos compostos mais bem ranqueados em cinco repetições, em relação ao ligante de referência. Neste caso, quanto o menor valor, melhor o escore.

Composto	Escore médio
85340592	-10,10 +/- 0,00
77256922	-9,90 +/- 0,00
253389983	-9,33 +/- 0,04
110266711	-9,23 +/- 0,04
25338998	-9,65 +/- 0,05
Ligante referência	-9,00 +/- 0,00

Dentre os cinco compostos selecionados pela varredura virtual, o que apresentou menor toxicidade e melhor score no docking foi o composto Zinc77256922 (figura 1).

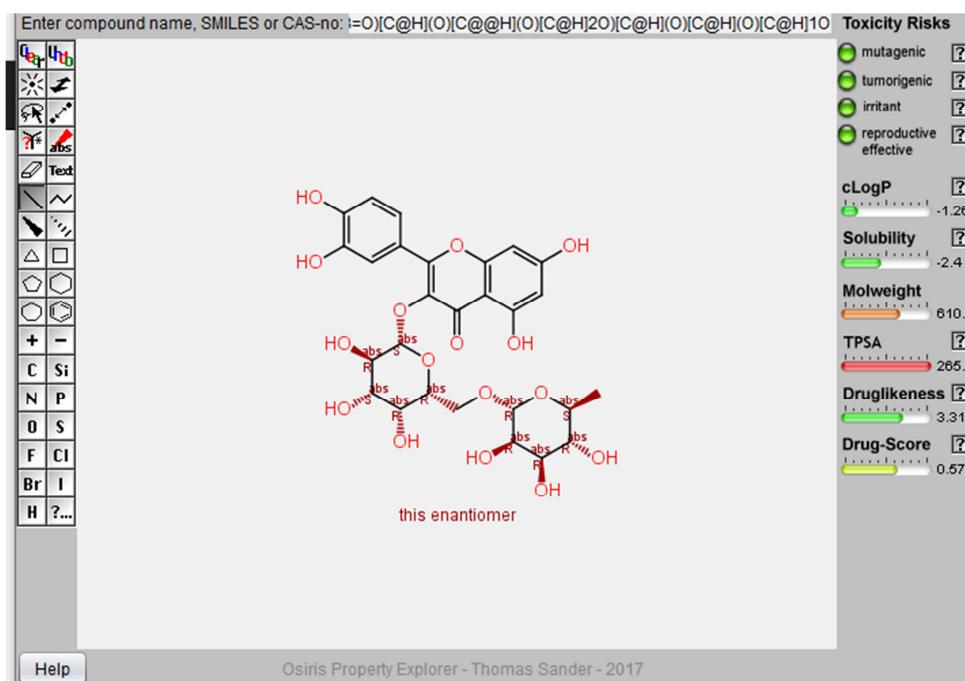




Figura 01. Estrutura química do composto Zinc77256922 selecionado na varredura virtual e avaliação da toxicidade *in silico* por meio do programa Osiris Property Explorer.

Levando em consideração os critérios *ADME/Tox*, a melhor molécula candidata a fármaco encontrada nesta pesquisa foi a Zinc77256922, pois possui o melhor *drug score* e maior probabilidade de se ligar à proteína alvo.

Conclusões

Os resultados sugerem que a molécula Zinc77256922 tem maior probabilidade de se ligar à proteína alvo no vírus Dengue e baixa probabilidade de causar efeitos tóxicos em mamíferos. Desta forma, este composto pode agora ser adquirido para ser testado como candidato a inibidor da enzima e inibidor da atividade antiviral por meio de estudos *in vitro*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Araucária, FINEP e PIBIC/UEM pelo auxílio financeiro.

Referências

CÂMARA, F. P. et al. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 192-196, 2007.

NOBLE, C. G. et al. Ligand-bound structures of the dengue vírus protease reveal the active conformation. **Journal of Virology**, v. 86, n. 1, p. 438-446, 2012.

PAMBUDI, S. et al. 2013. A Small Compound Targeting the Interaction between Nonstructural Proteins 2B and 3 Inhibits Dengue Vírus Replication. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 3, p. 393-398, 2013.