



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**LETÍCIA RÉGIA LIMA CAVALCANTE**

**VIRTUAL SCREENING E BIOQUÍMICA QUÂNTICA DE POTENCIAIS  
INIBIDORES DA PROTEÍNA NÃO-ESTRUTURAL 2 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

**FORTALEZA**

**2018**

LETÍCIA RÉGIA LIMA CAVALCANTE

VIRTUAL SCREENING E BIOQUÍMICA QUÂNTICA DE POTENCIAIS  
INIBIDORES DA PROTEÍNA NÃO-ESTRUTURAL 2 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial  
à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C364v Cavalcante, Leticia Régia Lima.

Virtual screening e bioquímica quântica de potenciais inibidores da proteína não-estrutural 2 do vírus Chikungunya / Leticia Régia Lima Cavalcante. – 2018.  
56 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.

1. Chikungunya. 2. nsP2. 3. Virtual screening. I. Título.

CDD 661

---

LETÍCIA RÉGIA LIMA CAVALCANTE

VIRTUAL SCREENING E BIOQUÍMICA QUÂNTICA DE POTENCIAIS  
INIBIDORES DA PROTEÍNA NÃO-ESTRUTURAL 2 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial  
à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Valder Nogueira Freire (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Hélio Costa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ito Liberato Barroso Neto  
Centro Universitário Unichristus

The mystery of the beginning of all things is insoluble by us; and I for one must be content to remain an agnostic.

- Charles Darwin

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo o esforço que sempre tiveram para me proporcionar uma excelente educação, por todo o amor, carinho e apoio, e por terem me dado o maior amor da minha vida, o “my brother” Kauã.

Agradeço ao meu irmão Kauã por ser o meu porto seguro, a minha melhor companhia, por ter o incrível poder de me alegrar não importa o que aconteça.

Agradeço à toda a minha família, em especial à minha tia Sônia, a quem eu tenho como uma segunda mãe, e à Camilly, minha primeira irmãzinha e que sempre será minha pequena Milly.

Agradeço ao meu Orientador, professor Valder Nogueira Freire, por ter me acolhido em seu laboratório e por todos os ensinamentos e ao professor Geancarlo, por todo o apoio, pelos conselhos e por estar sempre disposto a ajudar.

Agradeço aos colegas de laboratório Ito, Larisse, Luca, Manuela, Matheus e Thaís pelo companheirismo e por terem se tornado verdadeiros amigos.

À todos os amigos que pude fazer ao longo dos anos de faculdade, em especial à Brenda, Dayane, Larisse, Bruna, Matheus, Lucas e Farias.

Aos amigos do intercâmbio, em especial ao Fábio e Nonato, pelas experiências compartilhadas, pelo aprendizado, pelas dificuldades vencidas, por todos os jantares “em família” e por terem me ensinado que “home is where the heart is”.

À Universidade Federal do Ceará e à todos os docentes do curso de biotecnologia, que me proporcionaram excelente ensino, e à secretaria do curso na pessoa do Gilmar, sempre solícito e apto a resolver qualquer problema.

Às agências de Fomento Capes e CNPQ pelas bolsas de iniciação científica e de graduação sanduíche que contribuíram para a minha formação e experiências.

À todas as pessoas que passaram por mim ao longo destes anos e, de alguma forma, ajudaram a moldar quem eu sou hoje.

## RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV), pertencente ao gênero *Alphavirus*, é transmitido principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* e caracteriza-se por causar severas dores nas articulações. Dentre as proteínas que compõem CHIKV, a proteína não-estrutural 2 (nsP2) possui uma atividade proteolítica central na maturação do complexo de replicação viral e, portanto, sua inativação elimina a replicação do vírus. O objetivo deste trabalho foi identificar moléculas com potencial atividade inibitória do CHIKV utilizando como alvo o sítio proteolítico da nsP2 (pdb: 3TRK). Foi realizado um *screening* virtual de drogas, que consistiu no *docking* molecular (*software* Vina) de uma biblioteca de compostos (obtida do banco de dados *Zinc12*) no sítio ativo da proteína alvo. Dos 4999 compostos testados, 1690 apresentaram *score* mais negativo que -6,0 kcal/mol, indicando maior probabilidade de interação. As duas moléculas com os melhores *scores* (ZINC67460397, denominado LIG1, e ZINC67513969, denominado LIG2) foram selecionadas para uma análise mais detalhada da interação com a proteína através de dinâmica molecular. Assim, foi possível constatar que, mesmo tendo o mesmo *score* no *docking*, os compostos apresentaram comportamentos muito diferentes na interação com a nsP2. No tempo de simulação realizado, apenas o LIG1 se estabilizou no sítio de ligação da nsP2. Foram observados ajustes conformacionais importantes que levaram a essa estabilização. O estudo quântico das interações deste ligante com a proteína revelou fortes energias atrativas com os resíduos do sítio catalítico (Cys1013 e His1083). Os resíduos que apresentaram maior contribuição foram Cys1013, Tyr1047, Asn1082, Met1238, Asn1011, Ala1046, Met1242, Ala1010, Ser1048, Tyr1079 e His1083. Foram identificados ainda resíduos próximos com baixa contribuição energética, que podem guiar o desenho racional de modificações para melhorar a interação. A energia total de ligação calculada até o raio de 10 Å de interação foi de -89,5 kcal/mol. As observações feitas neste estudo fornecem bases para o desenvolvimento de novas drogas contra o vírus Chikungunya e apontam LIG1 como um candidato promissor. Como perspectiva, pretende-se expandir a análise do *screening* avaliando um número maior de compostos identificados.

**Palavras-chave:** CHIKUNGUNYA; nsP2; VIRTUAL SCREENING.

## ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV), belonging to the genus *Alphavirus*, is transmitted mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes and is characterized by causing severe joint pain. Among the proteins that make up CHIKV, nsP2 has a central proteolytic activity in the maturation of the viral replication complex and, therefore, its inactivation eliminates virus replication. The aim of this work was to identify molecules with potential inhibitory activity of CHIKV targeting the proteolytic site of nsP2 (pdb: 3TRK). A virtual drug screening, consisting of the molecular docking (Vina software) of a compound library (obtained from the Zinc12 database) at the active site of the target protein was performed. Among 4999 compounds tested, 1690 presented a score that was more negative than -6.0 kcal / mol, indicating a higher probability of interaction. The two molecules with the best scores (ZINC67460397, denominated LIG1, and ZINC67513969, denominated LIG2) were selected for a more detailed analysis of the interaction with the protein through molecular dynamics. Thus, it was found that, even though they had the same score in the docking, the compounds presented very different behaviors in the interaction with nsP2. At the simulation time performed, only LIG1 stabilized at the nsP2 binding site. Important conformational adjustments were observed that led to this stabilization. The quantum study of the interactions of this ligand with the protein revealed strong attractive energies with the catalytic site residues (Cys1013 and His1083). The residues that showed the greatest contribution were Cys1013, Tyr1047, Asn1082, Met1238, Asn1011, Ala1046, Met1242, Ala1010, Ser1048, Tyr1079 and His1083. Residues with low energy input were also identified, which may guide the rational design of modifications to improve the interaction. The total binding energy calculated up to the 10 Å interaction radius was -89.5 kcal / mol. The observations made in this study provide a basis for the development of new drugs against the Chikungunya virus and point to LIG1 as a promising candidate. As a perspective, we intend to expand the screening analysis by evaluating a larger number of identified compounds.

**Keywords:** CHIKUNGUNYA; nsP2; VIRTUAL SCREENING.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Organização do genoma dos alfavírus e seus produtos gênicos.	14
<b>Figura 2 -</b>	Representação da estrutura de um alfavírus.....	15
<b>Figura 3 -</b>	Ciclo de replicação de um alfavírus.....	16
<b>Figura 4 -</b>	Alinhamento entre as sequências de nsP2 de vários alfavírus.....	17
<b>Figura 5 -</b>	Representação da estrutura cristalográfica da nsP2 do vírus chikungunya.....	24
<b>Figura 6 -</b>	Distribuição de moléculas candidatas para cada valor de energia.....	33
<b>Figura 7 -</b>	Estrutura química dos ligantes.....	36
<b>Figura 8 -</b>	Mapa de densidade eletrônica de cada um dos ligantes.....	36
<b>Figura 9 -</b>	Representação da proteína nsP2 complexada com os ligantes 1 e 2 na pose de menor energia do docking.....	37
<b>Figura 10 -</b>	Representação 2D das interações proteína-ligante para o complexo nsP2-LIG1.....	38
<b>Figura 11 -</b>	Representação 2D das interações proteína-ligante para o complexo nsP2-LIG2.....	39
<b>Figura 12 -</b>	Variação de RMSD ao longo da simulação de dinâmica molecular para o ligante 1.....	41
<b>Figura 13 -</b>	Variação de RMSD ao longo da simulação de dinâmica molecular para o ligante 2.....	41
<b>Figura 14 -</b>	Comparação entre as posições inicial e final do ligante 1 na dinâmica molecular.....	42
<b>Figura 15 -</b>	Formação de interações entre o ligante 1 e resíduos próximos ao final da dinâmica.....	43
<b>Figura 16 -</b>	Comparação entre as posições inicial e final do ligante 2 na dinâmica molecular.....	43
<b>Figura 17 -</b>	Formação de interações entre o ligante 2 e resíduos próximos ao final da dinâmica.....	44
<b>Figura 18 -</b>	Diagrama 2D das interações presentes ao final da dinâmica dos complexos nsP2-LIG1 (A) e nsP2-LIG2 (B).....	45

<b>Figura 19 -</b>	Evolução da energia total de interação do sistema no raio crescente de interação.....	47
<b>Figura 20 -</b>	Incrementos na energia total do sistema por raio de interação....	47
<b>Figura 21 -</b>	Painel BIRD contendo os resíduos dentro do raio de interação de 5 Å a partir do ligante.....	49
<b>Figura 22 -</b>	Representação espacial dos resíduos mais relevantes para a energia do sistema.....	50
<b>Figura 23 -</b>	Representação espacial de resíduos próximos com baixa energia de interação.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Critérios utilizados na prospecção da biblioteca de ligantes a partir do Zinc12.....	26
<b>Tabela 2</b>	Resumo dos 15 compostos com energia de ligação mais negativas identificados no <i>screening</i> .....	34
<b>Tabela 3</b>	Propriedades químicas dos dois candidatos principais.....	36

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Alphavirus.....	13
1.1.1 <i>Organização do genoma e estrutura</i> .....	13
1.1.2 <i>Ciclo de replicação</i> .....	15
1.1.3 <i>Proteína não-estrutural 2 (nsP2)</i> .....	17
1.2 Vírus Chikungunya.....	19
1.2.1 <i>Epidemiologia</i> .....	19
1.2.2 <i>Características da infecção</i> .....	19
1.2.3 <i>Tratamento</i> .....	20
1.3 Métodos computacionais aplicados a descoberta de drogas.....	21
1.3.1 <i>Atracamento Molecular</i> .....	22
1.3.2 <i>Dinâmica Molecular</i> .....	22
1.3.3 <i>Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas (MFCC)</i> .....	23
1.4 Proteína não-estrutural 2 (nsP2) de Chikungunya como alvo terapêutico...	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1 Ajuste da estrutura da nsP2.....	26
3.2 Prospecção da biblioteca química.....	26
3.3 Docking dos compostos da biblioteca química no sítio proteolítico de nsP2.	27
3.4 Análise dos principais candidatos.....	27
3.4.1 <i>Dinâmica Molecular</i> .....	27
3.4.2 <i>Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas</i> .....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
4.1 <i>Screening</i> da biblioteca química.....	31
4.2 Análise dos principais candidatos.....	35
4.2.1 <i>Docking molecular</i> .....	37
4.2.2 <i>Dinâmica molecular</i> .....	40
4.2.3 <i>Cálculo quântico da energia de interação</i> .....	46
<b>CONCLUSÕES</b> .....	51

**PERSPECTIVAS..... 52**  
**REFERÊNCIAS..... 53**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Alphavirus*

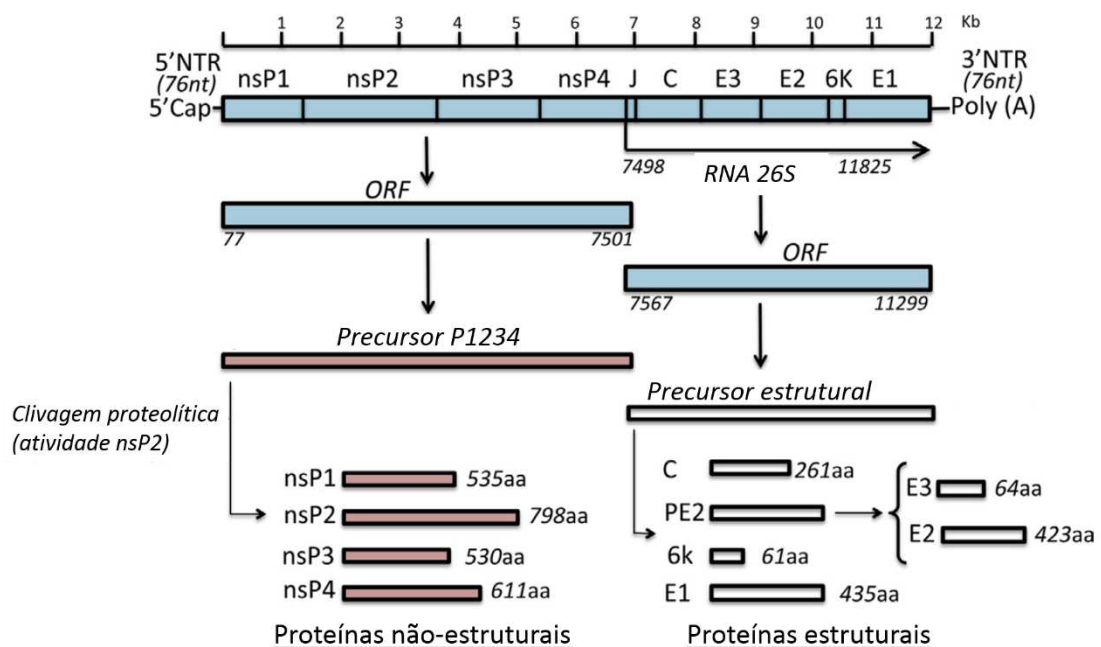
*Alphavirus* é um gênero de vírus pertencente à família *Togaviridae*. Este gênero compreende aproximadamente 30 espécies de vírus (BROWN et al, 2018), dentre os quais podem ser citados diversos representantes com reconhecida importância médica e veterinária, como os vírus causadores da encefalite equina do Leste, do Oeste e venezuelana (EEEV, WEEV, e VEEV), o vírus do Rio Ross (RRV) e o vírus Chikungunya (CHIKV). Os vírus pertencentes a este gênero são classificados como arbovírus, ou seja, são essencialmente transmitidos por vetores artrópodes. Geralmente, são disseminados para os humanos através dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* causando infecções agudas que se caracterizam por febre alta e erupções cutâneas podendo causar fortes dores nas articulações ou inflamações no cérebro (FROS & PIJLMAN 2016). A combinação de fatores como a expansão de populações de mosquitos, a evolução adaptativa dos vírus, que possibilitou a transmissão através de novos mosquitos vetores, e o aumento de viajantes internacionais contribuiu para o espalhamento dos alfavírus pelo mundo (FROS & PIJLMAN 2016; STRAUSS & STRAUSS 1994). Muito do entendimento atual sobre os alfavírus vem do uso do vírus Sindbis (SINV) e do vírus Semliki Forest (SFV) como modelos experimentais em sistemas de cultura de células de mamíferos e os resultados são amplamente aplicados ao gênero (BROWN et al, 2018).

#### 1.1.1 *Organização do genoma e estrutura*

O genoma dos alfavírus é constituído de RNA senso positivo de fita simples, geralmente tem entre 9 e 12 kb de comprimento e apresenta elementos como um cap 5' e cauda poli-A 3'. Existem duas janelas de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*), cada uma responsável pela síntese de um grupo de proteínas com função relacionada (SINGH & UNNI 2011). A primeira delas, que cobre dois terços do genoma viral na porção 5', é traduzida diretamente do RNA genômico e resulta na expressão das proteínas não-estruturais do vírus. O processo ocorre por meio da síntese de uma poliproteína não estrutural, denominada P1234, que, após realizar uma série de auto-clivagens, resulta na liberação das proteínas não-estruturais funcionais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. Este

conjunto de proteínas não-estruturais formam a maquinaria de replicação viral. A atividade proteolítica responsável pelo processamento da P1234 encontra-se na proteína não-estrutural 2, ou nsP2 (MERITS et al., 2001; STRAUSS et al., 1992). Portanto, sua atividade tem um papel central na replicação do vírus. Uma segunda janela de leitura aberta, localizada na terceira parte do genoma, codifica os precursores das proteínas virais estruturais através de um processo diferente do descrito anteriormente. Neste caso, ao invés de ser traduzido diretamente, o RNA genômico é usado como molde para a síntese de um RNA complementar senso negativo. Este RNA intermediário servirá de molde para a síntese de um RNA subgenômico dentro das células infectadas, do qual serão traduzidas as proteínas estruturais do envelope (E1, E2, E3 e 6k) e do capsídeo (Cp). Algumas proteínas estruturais necessitam passar por processamento proteolítico realizado por proteases endógenas do hospedeiro. Um esquema da organização do genoma dos alfavírus é mostrado na figura 1.

Figura 1: Organização do genoma dos alfavírus e seus produtos gênicos.

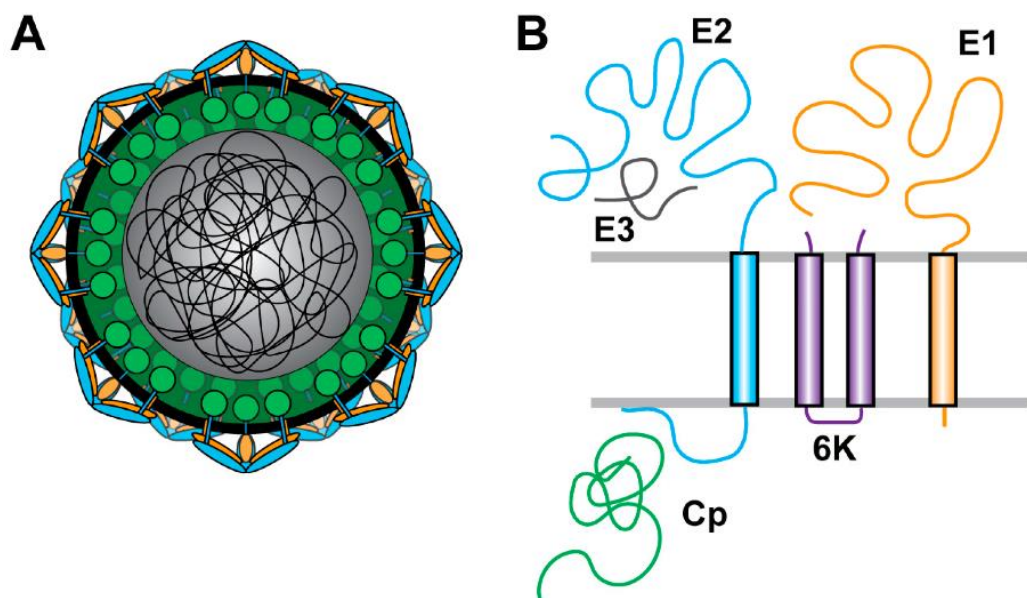


Fonte: Adaptado de THIBERVILLE et al., 2013.

Os alfavírus são vírus envelopados que formam pequenas partículas esféricas de aproximadamente 70 nm e simetria icosaédrica (FIELDS et al. 2013). Eles formam partículas altamente organizadas que incorporam parte da membrana plasmática das células infectadas do hospedeiro. A camada proteica externa da

partícula viral é arranjada em uma grade contendo 240 heterodímeros das proteínas virais do envelope E1 e E2 que são organizados em 80 trímeros embebidos na superfície (BROWN et al, 2018). E1 e E2 são glicoproteínas transmembranares, sendo que o domínio interno C-terminal de E2 tem contato direto com o core do nucleocapsídeo viral. A parte interna do capsídeo é composto por 240 cópias da proteína do capsídeo Cp arranjadas em padrão icosaédrico ao redor do genoma viral. Na figura 2 é possível observar uma representação da partícula viral e da disposição das proteínas estruturais do vírus na superfície viral.

Figura 2: Representação da estrutura de um alfavírus.



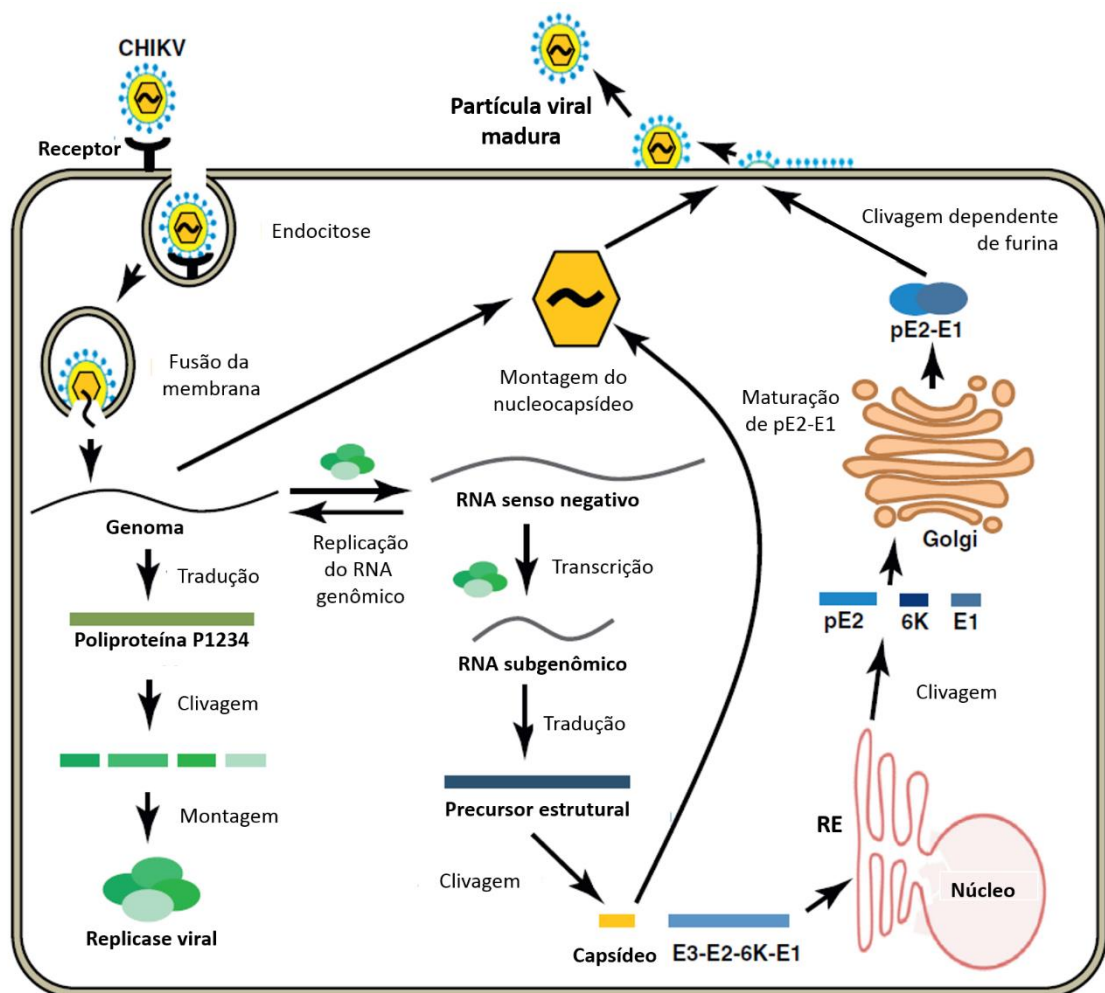
Fonte: Adaptado de BROWN *et al.*, 2018. (A) Ilustração de uma partícula alfaviral. (B) Conjunto de proteínas estruturais que compõem a partícula viral em suas determinadas posições.

### 1.1.2 Ciclo de replicação

Os alfavírus iniciam o processo de invasão nas células do hospedeiro através da ligação a receptores proteicos na superfície celular, posteriormente passando por endocitose. O receptor específico utilizado varia entre as espécies de alfavírus. Até o momento, somente o receptor para o vírus Sindbis (SINV), que é o transportador de metais NRAMP2, foi identificado (PANDA et al. 2013; ROSE et al. 2011). Os receptores celulares para outros alfavírus, como o CHIKV, permanecem desconhecidos. Após a internalização, a vesícula endocítica contendo o vírus se torna cada vez mais ácida, incitando uma série de eventos que culminam na fusão entre as membranas viral e celular. Primeiramente, o baixo pH causa mudanças

conformacionais nas proteínas estruturais do vírus que levam à dissociação do dímero E2/E1. Então, são formados homodímeros de E1 com a inserção do loop de fusão presente nesta proteína na membrana endossomal. Por fim, ocorre a fusão das membranas, que deposita o nucleocapsídeo do vírus no citoplasma. O processo de desmontagem do capsídeo não é completamente elucidado. As proteínas não-estruturais são expressas, formando o complexo de replicação que, além de replicar o RNA viral, também sintetiza o RNA subgenômico correspondente a segunda ORF que servirá de molde para a síntese das proteínas estruturais. A formação da nova partícula viral inicia-se no citoplasma com a montagem do arcabouço proteico. Esta partícula se associa a membrana celular, pela qual é envelopada e então liberada (BROWN R. et al, 2018). O ciclo de replicação dos alfavírus está ilustrado na figura 3.

Figura 3: Ciclo de replicação de um alfavírus.

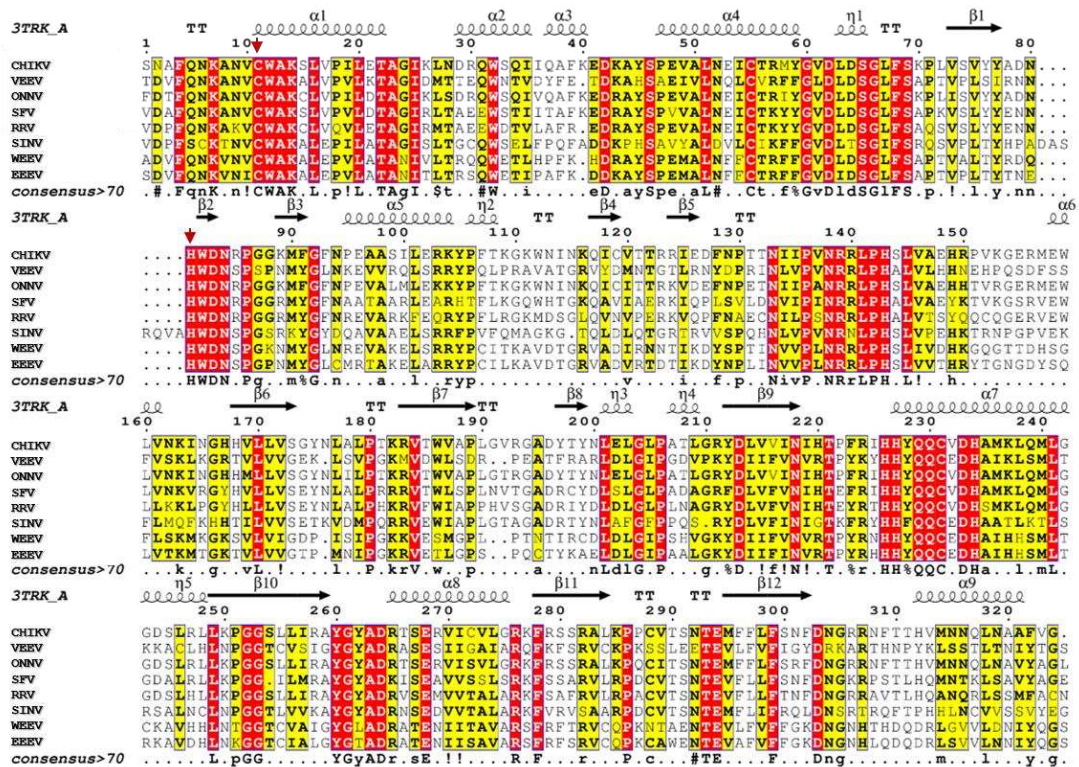


Fonte: Adaptado de KAUR & CHU 2013.

### 1.1.3 Proteína não-estrutural 2 (nsP2)

Dentre as proteínas não-estruturais dos alfavírus, a nsP2 destaca-se pela sua importância. Ela é responsável pela maturação da maquinaria de replicação viral e apresenta alto grau de identidade e conservação dentre as espécies do gênero, como ilustrado no alinhamento das sequências de aminoácido das nsP2 de vários alfavírus mostrado na figura 4.

Figura 4: Alinhamento entre as sequências de nsP2 de vários alfavírus.



Fonte: Elaborado pela autora com auxílio do servidor ESPript 3. Os resíduos catalíticos são apontados nas setas vermelhas. A estrutura de referência é a da nsP2 de Chikungunya (pdb: 3TRK).

Hardy e Strauss (1989) mapearam a nsP2 de SINV através de estudos envolvendo a deleção de aminoácidos e concluíram que apenas deleções no domínio C-terminal da proteína eliminavam a atividade enzimática por completo. Eles sugeriram que a enzima seria uma protease *papain-like* e que os resíduos catalíticos seriam uma cisteína e uma histidina conservados dentro deste domínio. Posteriormente, foi confirmado por meio de análises mutagênicas que a díade catalítica da nsP2 de SINV seria formada por Cys481 e His558 (STRAUSS et al. 1992), correspondendo aos resíduos Cys1013 e His1083 em CHIKV. Este foi o primeiro estudo de identificação dos resíduos catalíticos das proteases de alfavírus. Todavia, o estudo também apontou diferenças importantes. Apesar de um resíduo

de asparagina ter uma função sugerida para a catálise da papaína, foi demonstrado que nenhum resíduo de asparagina na nsP2 de SINV é requerido para a atividade proteolítica. Em vez disso, um resíduo de triptofano adjacente à His catalítica é requerido para a atividade, visto que na maioria das proteases da família são encontrados resíduos de cadeia lateral pequena nesta posição. Estudos posteriores expandiram a confirmação desta díade catalítica para as nsP2 de outros alfavírus.

Além das proteases de alfavírus, diversas proteases vegetais, como a bromelaína e actinidina, e animais, como a calpaína e as catepsinas, também fazem parte da família *papain-like*, apresentando a díade Cys-His conservada. Apesar desta conservação, elas diferem quanto a especificidade de substrato, o que pode ser atribuído aos diferentes padrões de sequência observados ao redor dos resíduos catalíticos das proteases de cada classe de organismo. O E64d é uma droga solúvel em membranas utilizada para a inibição de calpaínas e catepsina B. Em células, ele é convertido no seu derivado E64c que difere pela presença de um grupamento ácido no lugar de um grupamento éster no E64d. Ambos são fortes inibidores de papaína, sendo que atividade inibitória de E64c contra papaína é observada em concentração na escala de nanomolares. Ao avaliar a eficiência de inibição destas duas moléculas contra a protease nsP2 de VEEV, Hu e colaboradores (2016) observaram que nenhuma delas foi capaz de inibir a enzima em ensaios com cultura de células. Somente E64d demonstrou atividade em ensaio de incubação com a proteína. Este estudo ilustra a diferença de afinidade de inibidores pelas diferentes enzimas da mesma família. Apesar de sugerir que inibidores conhecidos de papaína não seriam tão eficientes na inibição das proteases alfavirais, estas informações apontam para a possibilidade de desenvolver inibidores seletivos para elas, de modo que estes não tenham ações em alvos indesejados e possam ser utilizados de forma segura e efetiva no tratamento de infecções por alfavírus.

O mecanismo catalítico da protease envolve a formação de um par iônico entre o grupo tiol da cisteína e o imidazol da histidina com posterior ataque nucleofílico do íon mercaptídeo livre ao substrato (POLGAR 1974). Além desta atividade proteolítica presente no domínio C-terminal, a nsP2 alfaviral apresenta atividades NTPase, RNA helicase, e RNA trifosfatase no seu domínio N-terminal (GOMEZ et al., 1999; KARPE et al., 2011; PASTORINO et al., 2008).

## **1.2 Vírus Chikungunya**

### **1.2.1 Epidemiologia**

O vírus Chikungunya teve sua origem na África, onde mantinha um ciclo primitivo enzoótico envolvendo primatas selvagens e mosquitos da floresta. O primeiro caso de febre Chikungunya registrado ocorreu em 1952 no planalto Makonde, localizado entre as fronteiras da Tanzânia e Moçambique. Um ano depois, em 1953, o vírus foi isolado pela primeira vez do soro de um indivíduo infectado em uma epidemia no distrito de Newala, Tanzânia (ROSS 1956). O vírus foi introduzido no sudeste asiático e Índia, onde passou a ser transmitido para humanos pelos mosquitos *Aedes* spp. através de um ciclo de transmissão urbano e causou sua primeira grande epidemia (PRESTI A. et al, 2014). Ao longo do tempo, mutações da cepa original possibilitaram transmissão por vetores diferentes e a dispersão para outras partes do mundo.

Uma grande onda de epidemias se iniciou em 2004 na África, com surtos registrados em diversas regiões. Ao final do mesmo ano, surgiram os primeiros casos em ilhas do Oceano Índico, incluindo Comoros e La Reunion. Entre 2005 e 2007, La Reunion foi tomada por uma grande epidemia que atingiu 34% da população da ilha. Vários casos foram reportados na Europa durante o ano de 2006, atingindo países como Itália, França, Alemanha e Inglaterra.

A chegada do vírus às Américas ocorreu pelo Caribe em outubro de 2013, resultando em milhares de infecções. O primeiro caso autóctone no Brasil, ou seja, quando o indivíduo é infectado dentro do país, ocorreu em setembro de 2014, na cidade de Oiapoque, Amapá (FIGUEIREDO 2017). Somente no país, o número de casos registrados de Chikungunya subiu de 38.499 em 2015 para 271.824 em 2016, de acordo com boletins do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No primeiro semestre de 2017, ocorreram surtos de infecção por Chikungunya em praticamente todas as regiões. O estado do Ceará teve o surto mais severo neste período, com mais de 80.000 casos confirmados (NUNES et al. 2015).

### **1.2.2 Características da infecção**

Os sintomas da infecção por CHIKV incluem febre alta, calafrios, dores de cabeça e musculares, sensibilidade a luz, erupções cutâneas e severa

artralgia. A maioria dos pacientes infectados relatam fortes dores nas articulações, frequentemente incapacitantes. Este sintoma é tão relevante, que está envolvido com a história do nome da doença. A palavra Chikungunya provém do dialeto africano Makonde e significa “aqueles que se dobram”, fazendo alusão ao efeito causado pelas dores nas articulações na forma de andar do paciente. Além dos sintomas clássicos citados, a infecção por CHIKV pode causar descompensação de doenças preexistentes (CUNHA & TRINTA 2017) ou a ocorrência de sintomas atípicos (ECONOMOPOULOU et al. 2009; TORRES et al. 2014). Após a transmissão, o CHIKV replica-se na pele e dissemina-se para o fígado, músculo, articulações, tecido linfático e cérebro através do sangue (DUPUIS-MAGUIRAGA et al. 2012; SCHWARTZ & ALBERT 2010). Os eventos patológicos associados com a infecção tecidual são principalmente subclínicos no fígado, onde ocorre apoptose de hepatócitos, e nos órgãos linfáticos, onde é observada adenopatia. Já a infecção do músculo e articulações é associada com as fortes dores observadas (DUPUIS-MAGUIRAGA et al. 2012; SCHWARTZ & ALBERT 2010). A doença é endêmica de regiões tropicais, onde o ambiente é propício à proliferação dos vetores, e costuma atingir populações menos favorecidas.

### **1.2.3 Tratamento**

O tratamento desta virose ainda é focado apenas no alívio dos sintomas, visto que não há tratamento específico que tenha o vírus como alvo (BURT et al. 2012; THIBERVILLE et al. 2013). A principal recomendação no início da fase aguda de infecção é o repouso absoluto e hidratação. Nesta fase, podem ser utilizados medicamentos como paracetamol e dipirona para o alívio da dor e febre. Porém, devem ser evitadas drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs) ou glicocorticoides. Para as dores nas articulações na fase pós-aguda, ambos AINEs ou glicocorticoides em doses antiinflamatórias voltam a ser indicados. Caso as dores sejam persistentes, atingindo uma fase crônica, são utilizados tratamento específicos anti-reumáticos (CUNHA & TRINTA 2017).

Apesar da inexistência até o momento de tratamentos antivirais licenciados específicos para tratar a infecção por CHIKV, a recorrência do vírus e sua relevância médica tem levado a uma grande busca por novos tratamentos. Algumas drogas tiveram efeito demonstrado *in vitro* contra o vírus Chikungunya (RASHAD et al. 2014). Porém, a grande maioria não apresenta o mesmo efeito *in*

*vivo* ou possui alguma limitação que impossibilita o seu uso terapêutico. Um exemplo é a cloroquina, uma droga anti-malária que, apesar de apresentar atividade *in vitro* contra membros do gênero alfavírus (CASSELL et al. 1984; HELENIUS et al. 1982), pode exacerbar a replicação viral *in vivo* quando administrada em ratos (MAHESHWARI et al. 1991). Similarmente, diversas tentativas de desenvolvimento de vacinas contra o vírus Chikungunya foram realizadas, mas nenhuma chegou ao mercado até o momento (BROWN R. et al, 2018; PRESTI A. et al, 2014; THIBERVILLE et al. 2013). Com a indisponibilidade de uma vacina para prevenir a infecção pelo vírus Chikungunya ou drogas antivirais que sejam efetivas, torna-se importante o desenvolvimento de novos fármacos que possam intervir e controlar a infecção já estabelecida. Assim, tem-se buscado moléculas com potencial terapêutico que tenham como alvo a inibição de proteínas específicas virais (BHAKAT et al. 2014; RASHAD et al. 2014).

### **1.3 Métodos computacionais aplicados a descoberta de drogas**

O avanço contínuo em biologia molecular e tecnologia da informação culminou no desenvolvimento de uma gama de ferramentas de simulação molecular que podem ser aplicadas com diversas finalidades, sendo uma delas a descoberta de drogas. O uso destas ferramentas de descoberta de medicamentos auxiliadas por computador tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento de moléculas pequenas com importância terapêutica (HUANG et al., 2010). Os métodos computacionais aplicados a descoberta de drogas são geralmente classificados como métodos baseados em estrutura ou baseados em ligantes (SLIWOSKI et al., 2014). Nos métodos baseados em estrutura, os ligantes são selecionados de acordo com a informação da estrutura alvo. Já nos métodos classificados como baseado em ligante, utilizam-se apenas as propriedades do ligante para prever sua atividade. Neste caso, é necessário haver o conhecimento de compostos reconhecidamente ativos ou inativos para que sejam explorados através de buscas de similaridade ou construção de modelos de predição da relação estrutura-atividade do composto. Assim, esta estratégia é geralmente utilizada quando há ausência de informação estrutural sobre o alvo. Isto é especialmente útil para alvos proteicos que apresentam grande dificuldade de cristalização, como é o caso das proteínas de membrana (SLIWOSKI et al., 2014). Já a abordagem baseada em estrutura é utilizada quando a estrutura tridimensional do alvo biológico

é conhecida e está disponível em boa resolução. Abordagens baseadas em estrutura incluem *docking* molecular, dinâmica molecular e métodos de planejamento de fármacos. Em adição aos métodos clássicos, estratégias que permitem calcular a nível quântico a energia de interação de sistemas biológicos podem ser utilizadas para aprofundar as análises sobre potenciais ligantes.

### **1.3.1 Atracamento Molecular**

O atracamento molecular (ou *docking* molecular) é um método que permite prever o modo de ligação mais provável de um ligante com uma proteína para formar um complexo estável (LENGAUER & RAREY, 1996). Este método é apontado como uma poderosa ferramenta para descoberta de drogas baseada em estrutura, já que considera exatamente a complementaridade estrutural entre uma molécula e um alvo proteico. Além de abordagens para desenvolvimento de fármacos, o *docking* molecular também tem sido utilizado para elucidar processos bioquímicos ou expandir a compreensão sobre o modo de interação entre ligantes e macromoléculas ou, até mesmo, entre macromoléculas (KITCHEN et al., 2004; LENGAUER & RAREY, 1996).

O método é composto por um algoritmo de busca e uma função de avaliação de energia denominada função score (GUEDES, 2014). O algoritmo de busca investiga possíveis conformações e orientações do ligante no sítio alvo considerando a energia livre de ligação, proveniente de interações eletrostáticas e de van der Waals, e a complementaridade estrutural. Assim, é investigado um grande número de poses de interação, que são depois avaliadas por meio da função score para encontrar aquelas mais relevantes (GONCALVES et al., 2014). Diversos softwares para cálculos de *docking* molecular estão disponíveis atualmente, cada um com seu algoritmo de busca e função score próprios (VERLI, 2014).

### **1.3.2 Dinâmica Molecular**

A metodologia de dinâmica molecular consiste na descrição dos movimentos dos átomos pertencentes a um sistema de acordo com a segunda lei de Newton, seja este formado por átomos individuais, moléculas ou moléculas em sólidos, líquidos ou gases. Parâmetros físicos como a aceleração, velocidade e posição dos átomos são avaliados ao longo de um tempo determinado por meio da integração das equações de movimento que descrevem o comportamento de

átomos e ligações em um meio, sendo o conjunto das funções aplicadas denominado campo de força. Assim, a metodologia de dinâmica molecular permite acompanhar a evolução no movimento dos átomos em um sistema ao longo do tempo (NAMBA et al., 2008; VERLI, 2014).

### **1.3.3 Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas (MFCC)**

Os métodos de mecânica quântica apresentam uma grande vantagem em relação a métodos baseados em mecânica molecular por conta da sua elevada acurácia. Porém, o cálculo mecânico quântico preciso de energias de interação para moléculas biológicas representa um grande desafio em bioquímica computacional pois a biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos normalmente possuem um elevado número de átomos, demandando elevada capacidade computacional.

O Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC, do inglês, Molecular Fractionation with Conjugate Caps) é um método que permite aplicar mecânica quântica para obter uma descrição precisa de sistemas biológicos, fornecendo cálculos *ab initio* de energias de interação entre, por exemplo, um fármaco e seu alvo proteico (ZHANG & ZHANG, 2003; HE & ZHANG, 2005; GORDON et al., 2012). A técnica consiste na fragmentação de sistemas compostos por grandes moléculas, como proteínas, em pequenas partes que conservam as propriedades eletrônicas e estruturais do sistema. Desta forma, é possível calcular a energia individual de cada uma destas partes e obter a energia total do sistema.

Cálculos quânticos foram aplicados na investigação de possíveis novos compostos inibitórios ao vírus da dengue (OURIQUE et al., 2016). Sousa e colaboradores (2016) mostraram, por meio de análise quântica, como ocorre a interação entre dois complexos proteicos envolvidos no equilíbrio de modelação óssea do corpo humano. Zanatta e colaboradores (2012) utilizaram a mesma metodologia para demonstrar como ocorre a interação do antipsicótico eticloprida com o receptor D3.

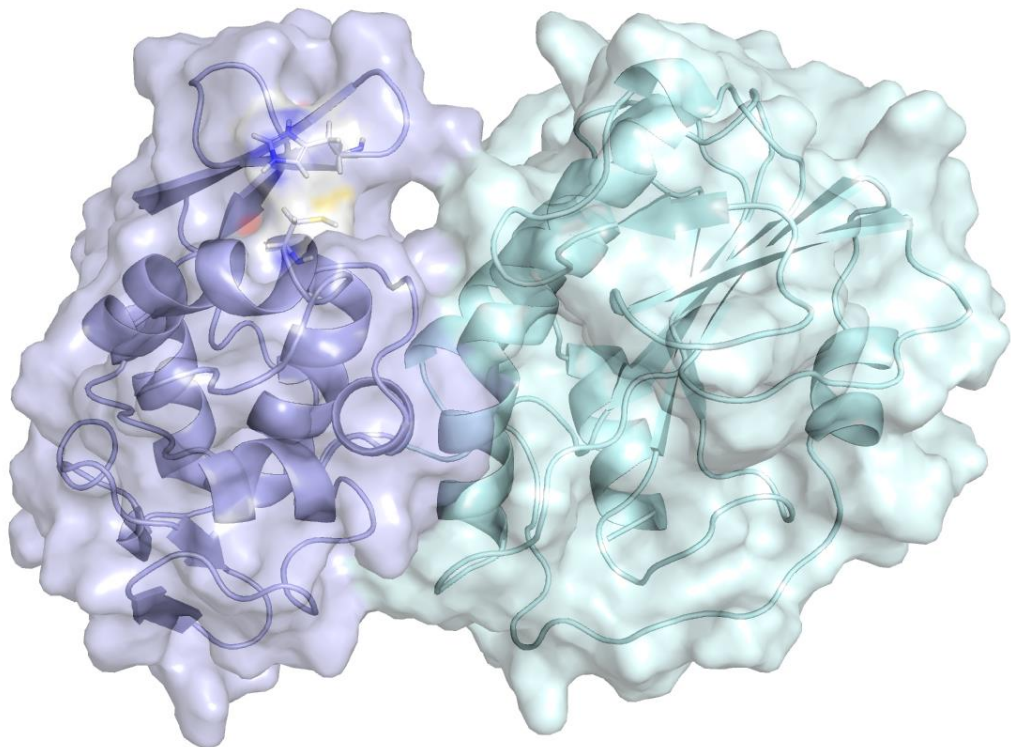
## **1.4 Proteína não-estrutural 2 (nsP2) de Chikungunya como alvo terapêutico**

Etapas proteolíticas fundamentais ocorrem no ciclo de infecção de diversos vírus, como é o caso do vírus Chikungunya, pertencente ao gênero *Alphavirus* (RAUSALU et al., 2016). Apesar de a poliproteína não-estrutural P1234

dos alfavírus possuir diversas atividades enzimáticas (SALONEN et al., 2003), ela é incapaz de realizar a replicação do RNA viral à níveis detectáveis sem passar pela autoproteólise realizada pela nsP2 (KALLIO et al., 20016). Utt e colaboradores (2014) demonstraram que mutações em CHIKV resultaram em um fenótipo não-tóxico do vírus por comprometer a atividade da nsP2. Assim, diversos autores têm indicado esta proteína como um alvo terapêutico promissor na busca de tratamentos específicos para combater a infecção pelo vírus Chikungunya (BHAKAT et al., 2014; DAS et al., 2016; RASHAD et al. 2014).

Em 2011, Cheung e colaboradores elucidaram e depositaram a estrutura cristalográfica da proteína nsP2 com uma resolução de aproximadamente 2,4 Å no banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas *Protein Data Bank* (PDB) sob o código de acesso 3TRK. A disponibilidade desta estrutura tornou possível a aplicação de metodologias *in silico* para o desenvolvimento de potenciais inibidores do sítio proteolítico da nsP2 baseando-se na sua complementaridade estrutural com o sítio ativo da proteína.

Figura 5: Representação da estrutura cristalográfica da nsP2 do vírus Chikungunya.



Fonte: Elaborado pela autora. Estrutura representada em *cartoon* com o domínio C-terminal em lilás e o domínio N-terminal em verde. Os resíduos catalíticos Cys-His são representados em bastão.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Identificar, a partir de uma biblioteca de compostos químicos, moléculas com potencial atividade inibitória do vírus Chikungunya utilizando como alvo o domínio proteolítico da proteína não-estrutural 2 (nsP2), sob a hipótese de que a inibição desta enzima leva à supressão da replicação do vírus.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar os ajustes necessários na estrutura da proteína nsP2 obtida a partir do banco de dados *Protein Data Bank*;
- Prospectar uma biblioteca de compostos químicos com propriedades estruturais desejáveis para potenciais fármacos a partir do banco de dados *Zinc12*;
- Realizar o *screening* através do *docking* molecular de cada molécula presente na biblioteca no sítio proteolítico da nsP2 utilizando o *software* Vina e ranqueá-los segundo a energia de ligação calculada;
- Analisar a estrutura e pose de interação dos compostos que apresentarem maiores energias de ligação com a proteína;
- Realizar a dinâmica molecular dos 2 candidatos com as maiores energias de interação de *docking* complexados com a nsP2; e
- Realizar o cálculo quântico da energia de interação dos complexos estabilizados após a dinâmica.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Ajuste da estrutura da nsP2

A estrutura tridimensional da proteína nsP2 do vírus Chikungunya foi obtida do banco de dados *Protein Data Bank* sob o código de acesso 3TRK. A estrutura foi resolvida pelo método de difração de raios X por Cheung e colaboradores (2011) a uma resolução de 2.397 Å.

Foram realizados alguns ajustes na estrutura para prepará-la para os passos seguintes. Inicialmente foram removidas as moléculas de água da estrutura. A seguir, foi realizada uma análise de protonação da estrutura em pH 7,4 com auxílio do servidor PDB2PQR e os hidrogênios ausentes foram adicionados de acordo com o pKa calculado para cada resíduo. As posições dos hidrogênios adicionados foram otimizadas por meio de mecânica clássica, mantendo-se as coordenadas originais para os demais átomos, utilizando o campo de força CHARMM27 através do programa Discovery Studio (Accelrys Software Inc., San Diego), que possui parâmetros específicos para aminoácidos (BROOKS et al., 2009; MACKERELL et al., 1998).

#### 3.2 Prospecção da biblioteca química

A biblioteca de compostos químicos foi obtida a partir do banco de dados de compostos químicos *Zinc12* (IRWIN & BRIAN, 2005) com base na regra de Lipinski (LIPINSKI et al. 1997), que estabelece propriedades químicas comumente encontradas em moléculas biologicamente ativas com boas propriedades de absorção, e extensões desta (VEBER et al. 2002). Os parâmetros empregados para selecionar os compostos são mostrados na tabela a seguir.

Tabela 1: Critérios utilizados na prospecção da biblioteca de ligantes a partir do *Zinc12*.

	Peso molecular (g/mol)	Doador de Lig-H	Aceptor de Lig-H	Área de superfície polar (Å <sup>2</sup> )	Carga global	Ligações rotáveis
<b>Mínimo</b>	200,00	1	2	0	-1	1
<b>Máximo</b>	350,00	5	10	140	0	10

Fonte: Elaborado pela autora.

A estrutura tridimensional dos compostos em sua forma química predominante em pH fisiológico de 7,4 foi obtida no formato MOL2 e convertida para o formato PDBQT para o *docking* utilizando o software Raccoon2 (FORLI et al., 2016).

### **3.3 Docking dos compostos da biblioteca química no sítio proteolítico de nsP2**

Para os cálculos de *docking* molecular, foi utilizado o *software* Vina, versão 1.1.2 (TROTT & OLSON, 2009). A interface gráfica do programa AutoDockTools (The Scripps Research Institute), versão 1.5.6, foi utilizada para a remoção de hidrogênios não polares, a adição de cargas parciais (Gasteiger charges) e geração do arquivo da proteína em formato PDBQT, requerido pelo Vina.

Foram realizados *dockings* dos 4.999 compostos inseridos na biblioteca química focados no sítio proteolítico da nsP2. Durante as simulações, a estrutura da proteína foi mantida fixa enquanto que as ligações rotáveis nos ligantes foram deixadas livres, aumentando assim a acurácia do cálculo de interação e permitindo um melhor ajuste do ligante no sítio. Foram geradas 9 poses para cada ligante, sendo considerada aquela de maior energia de interação calculada pela função score do *docking*. Os resultados foram ranqueados de acordo com a energia de interação entre os compostos e a proteína de estudo.

### **3.4 Análise dos principais candidatos**

Foi feita uma breve descrição da estrutura e inspeção visual das poses de interação de *docking* dos 2 candidatos com melhores *scores* no *docking* com a nsP2, ambos -7,8 kcal/mol. Para melhor avaliar a estabilidade da interação destes ligantes com a nsP2, foram realizadas simulações de dinâmica molecular dos dois complexos.

#### **3.4.1 Dinâmica Molecular**

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas com o objetivo de analisar a acomodação das moléculas candidatas no sítio de ligação da proteína nsP2. O programa VMD (Visual Molecular Dynamics) versão 1.9.2 (HUMPHREY et al., 1996) foi utilizado tanto na preparação dos arquivos necessários para a simulação como na análise dos resultados. As simulações foram configuradas de acordo com o protocolo utilizado por Maranhão e colaboradores (2017), onde foi

feita a solvatação do sistema em uma caixa de água (modelo TIP3) com margens de 30 Å em cada direção e o balanceamento e neutralização de cargas por meio da adição de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). Os resíduos de aminoácido pertencentes ao sítio de ligação da molécula candidata, selecionados adotando-se um limite de 3,5 Å de distância do ligante, foram deixados flexíveis durante a dinâmica, enquanto que foram aplicadas restrições para todos os outros resíduos para mantê-los fixos. Foi aplicada uma rampa de temperatura de 100 a 300 K em 20 mil passos e a dinâmica foi executada sob condições NTP (do inglês *normal temperature and pressure*) a 300 K. Foram realizados ainda mil passos de convergência de energia no início da simulação e 10 mil passos ao final. As simulações foram executadas com auxílio do programa NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics), versão 2.9, utilizando o campo de força CHARMM27 (MACKERELL et al., 1998; PHILLIPS et al., 2005) e teve duração de 20 ns para cada um dos complexos em estudo.

A evolução do sistema foi avaliada por meio do acompanhamento do RMSD (do inglês *root mean square deviation*), obtido através do programa VMD (Visual Media Dynamics). A medida do RMSD expressa a variação na posição dos átomos do sistema ao longo do tempo de simulação e, portanto, é considerado um importante critério para avaliar a estabilidade de um ligante (SHEN et al., 2013. EKHTEIARI et al., 2017). Foram feitas medidas do RMSD considerando todo o sistema, somente a proteína e somente o ligante.

### **3.4.2 Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas**

A técnica de MFCC foi utilizada para a análise do perfil de ligação das moléculas candidatas ao sítio proteolítico da nsP2. O uso desta técnica permitiu o cálculo quântico da energia de interação individual de cada aminoácido presente no sítio de ligação, o qual foi realizado utilizando-se a Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*), por meio do software DMOL3 (DELLEY, 1990) implementado no Materials Studio 7.0 (Accelrys Software Inc., 2013). A análise quântica considerou todos os resíduos presentes dentro de um raio de 10 Å a partir da molécula do ligante. Assim, foram traçados raios de 2,0 até 10 Å de distância a partir da molécula do ligante, variando 0,5 Å em cada medida, de modo que foi possível identificar em qual raio de distância em relação ao ligante encontrava-se cada resíduo. Os parâmetros utilizados no cálculo quântico por meio de DFT incluíram o uso da aproximação do gradiente

generalizado (GGA) com parametrização PBE e DNP+ (Double Numeric Polarization). As constantes dielétricas são amplamente utilizadas no estudo das propriedades eletrostáticas de biomoléculas. Neste trabalho, foi adotada uma constante dielétrica homogênea de 20 como padrão. A escolha deste valor foi baseada no trabalho de Vicatos e colaboradores (2009), que, após estudar diversas proteínas, concluíram que os melhores valores de constante dielétrica ( $\epsilon$ ) para interações envolvendo cargas estariam situadas na faixa de 1 e 40.

A descrição das interações para cada resíduo de interesse ( $R_i$ ) da proteína considerou, além dele, suas capas moleculares correspondendo aos resíduos anterior ( $R_{i-1}$ ) e posterior ( $R_{i+1}$ ) a ele e o ligante (Li). Para cada resíduo foram gerados quatro sistemas e calculada a energia de cada um deles separadamente. O primeiro sistema incluía o ligante, o resíduo de interesse e suas capas moleculares, o segundo incluía apenas pelo resíduo de interesse com suas capas moleculares, o terceiro sistema incluía apenas o ligante e as capas moleculares do resíduo de interesse e o quarto sistema incluía apenas as capas moleculares do resíduo de interesse. A partir das energias de cada um destes sistemas, foi realizada a operação algébrica definida a seguir, que tem como resultado a energia isolada entre o resíduo de interesse da proteína e o ligante, levando em consideração a influência das capas moleculares na interação. Assim, a energia de interação de um resíduo  $i$  é definida por:

$$E(LR_i) = E(L_i R_{i-1} R_i R_{i+1}) - E(R_{i-1} R_i R_{i+1}) - E(L_i R_{i-1} R_{i+1}) + E(R_{i-1} R_{i+1})$$

A energia total de ligação da molécula candidata com a nsP2 foi obtida através da soma algébrica das contribuições individuais de cada resíduo de aminoácido posicionado dentro do raio de 10,0 Å a partir do ligante. O gráfico da evolução da energia total do sistema por raio de interação, também denominado gráfico de convergência de energia, permite observar o ponto de convergência do sistema, ou seja, a partir do qual não são mais observados incrementos importantes de energia. O gráfico de energia por cada raio de interação permite definir em que raio encontram-se os resíduos com maiores contribuições para a energia do

sistema. Já as energias de interação individuais dos resíduos de aminoácidos da nsP2 com o ligante, foram plotadas em um painel denominado BIRD (do inglês, *Binding site, Interaction energy, and Residues Domain*), que descreve os resíduos mais importantes energeticamente para a interação do complexo nsP2 ligante. Estão presentes no painel criado todos os resíduos presentes até o raio de convergência do sistema. Dentre as informações presentes, estão a energia de ligação em kcal/mol de cada resíduo com o ligante, a região do ligante (i, ii ou iii) que está mais próxima de cada resíduo de interesse, o respectivo raio de distância em que se encontra o resíduo analisado da molécula do ligante e a presença de moléculas de água na interação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Screening* da biblioteca química

O *virtual screening* é uma metodologia de descoberta de drogas auxiliada por computador que tem como objetivo identificar, dentro de um conjunto de moléculas sem atividade biológica conhecida, aquelas que tenham maior probabilidade de interagir com um alvo proteico. É importante ressaltar que não está dentro do escopo desta metodologia identificar moléculas prontas para testes clínicos, mas sim filtrar aqueles candidatos seriam mais promissores para serem testados (SLIWOSKI et al., 2014). Assim, a principal vantagem desta metodologia é a possibilidade de cobrir uma proporção de moléculas que seria inviável por meio de *screening* experimental, tanto pelo custo quando pelo tempo e trabalho empregado (SHOICHET, 2004). Assim, além de reduzir o custo dos *screenings* experimentais por limitar drasticamente a quantidade de compostos a serem testados, o *screening* virtual utilizado como precedente a testes experimentais aumenta consideravelmente as chances de sucesso porque os compostos são filtrados com base em simulações computacionais que buscam se aproximar da realidade (LIONTA et al., 2014).

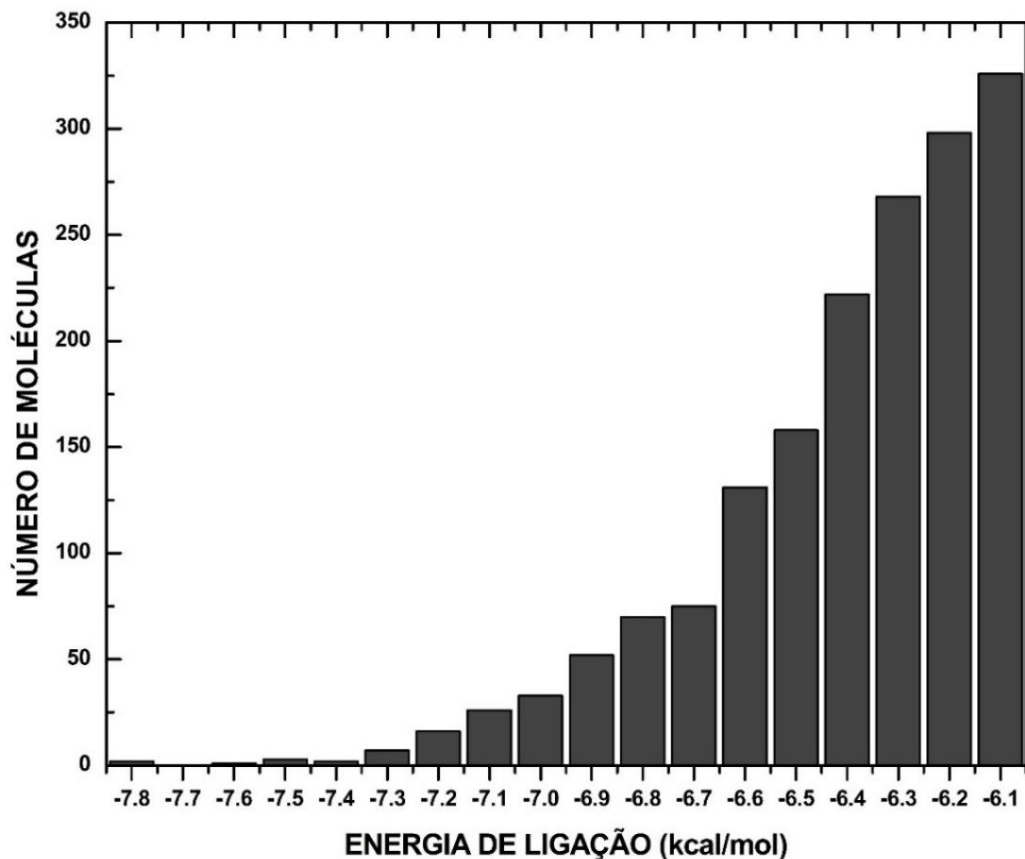
Metodologias de descoberta de drogas auxiliada por computador tem sido utilizadas na busca de novos inibidores para a nsP2 do vírus Chikungunya. Alguns destes estudos utilizam como estratégia o *design* racional de moléculas para posterior avaliação da capacidade de inibição (DAS et al., 2016; DHINDWAL et al., 2017). A literatura relacionada à *screenings* de ligantes focados na inibição de CHIKV foi recentemente revisada e concluiu-se que a área ainda é pouco explorada e apresenta muito potencial de desenvolvimento (JADAV et al., 2017). No presente trabalho, foi proposta uma busca por compostos anotados em bancos de dados e disponíveis comercialmente que tenham potencial de inibição contra a protease nsP2 do vírus Chikungunya. Estudos semelhantes reportados na literatura utilizaram exclusivamente o *docking* molecular para avaliar o potencial de inibição dos compostos (BYLER et al., 2016; JADAV et al., 2012).

Uma característica fundamental de moléculas candidatas a drogas e a sua capacidade em ser absorvida pelo organismo. Lipinski e colaboradores (1997) revisaram as propriedades químicas de diversos compostos que passaram por

testes clínicos e observaram as diferenças entre aqueles que tinham o uso aprovado e aqueles que falhavam. A partir deste estudo, eles definiram um conjunto de regras que reflete as características mais encontradas naquelas moléculas que tiveram sucesso nos testes clínicos, de modo que moléculas que se encaixem nessas regras teriam melhores propriedades de solubilidade e permeabilidade e, portanto, seriam melhor absorvidas. Este estudo, que ficou conhecido como a regra dos 5, e amplamente aplicadas em metodologias de busca de novos fármacos como critério de escolha. A definição dos critérios para prospecção dos ligantes que fizeram parte deste *screening* foi baseada na regra dos 5 de Lipinski. Além destes critérios, foram excluídas moléculas muito reativas e consideradas somente as formas predominantes em pH fisiológico (7,4). Assim, foi possível formar uma biblioteca química contendo 4999 compostos provenientes do banco de dados Zinc, uma coleção curada contendo milhares de compostos comercialmente disponíveis criada especificamente para metodologias de *virtual screening* (IRWIN & BRIAN, 2005).

Após o *docking* molecular, estes compostos foram ranqueados de acordo com a energia de ligação da pose de menor energia e um valor de corte de -6,0 kcal/mol foi adotado, tendo sido eliminadas 3309 moléculas. A figura 6 mostra o gráfico da quantidade de moléculas pelo resultado de energia de ligação do *docking*. É possível notar que a concentração de moléculas diminuí a medida que o grau de afinidade aumenta, sendo que pouquíssimas delas apresentaram as energias de ligação mais altas. A partir deste gráfico, torna-se visível o refinamento preliminar que pode ser feito utilizando-se a metodologia de *docking* molecular.

Figura 6: Distribuição de moléculas candidatas para cada valor de energia.



Fonte: Elaborado pela autora. Gráfico do número de moléculas pela energia de ligação calculada no *docking*. Total de moléculas: 1690.

A tabela 2 mostra os 15 candidatos com energias de ligação mais negativas, trazendo seu Zinc ID, que é o código individual da molécula no banco de dados, o nome IUPAC e o valor de energia. O *screening* por meio de *docking* representa apenas o primeiro passo na avaliação de potenciais novas drogas (SLIWOSKI et al., 2014). É importante que sejam feitos estudos mais detalhados sobre a interação ligante-proteína com maior nível de teoria para que possam ser realizados novos ranqueamentos dentre os compostos selecionados na primeira simulação. Neste trabalho, foi feita a análise da interação de ZINC67460397 e ZINC67513969 com a proteína nsP2 por meio de simulações de dinâmica molecular. Estes foram os dois candidatos que apresentaram melhores *scores* de *docking*, ambos com -7,8 kcal/mol. Para simplificação, estas moléculas serão referidas a partir daqui como LIG1 e LIG2.

Tabela 2: Resumo dos 15 compostos com energia de ligação mais negativas identificados no *screening*.

Nº	Zinc ID e nomenclatura IUPAC da molécula	Energia de Ligação (kcal/mol)
1	<b>ZINC67460397</b> : N-[(4R)-4-(1H-benzimidazol-2-yl)-2-oxo-3,4-dihydro-1H-quinolin-7-yl]acetamide	-7,8
2	<b>ZINC67513969</b> : N-[(5-methoxy-1H-benzimidazol-2-yl)methyl]-2,4-dioxo-1H-pyrimidine-6-carboxamide	-7,8
3	<b>ZINC67515201</b> : N-[2-[(4-methyl-2-pyridyl)amino]ethyl]-1-oxido-2,1,3-benzoxadiazol-1-ium-5-carboxamide	-7,6
4	<b>ZINC00452366</b> : benzamide, 3-chloro-N-[(2-naphthalenylamino)thioxomethyl]-	-7,5
5	<b>ZINC00170780</b> : 2-furancarboxamide, N-[(2-naphthalenylamino)thioxomethyl]-	-7,5
6	<b>ZINC19743139</b> : 6-(6-piperazin-1-yl-2-pyridyl)quinoline	-7,5
7	<b>ZINC02879498</b> : (2S)-N-[3-(5-chloro-1,3-benzoxazol-2-yl)phenyl]tetrahydrofuran-2-carboxamide	-7,4
8	<b>ZINC67472793</b> : N-[[2-(2-methylimidazol-1-yl)phenyl]methyl]-1-oxido-2,1,3-benzoxadiazol-1-ium-5-carboxamide	-7,4
9	<b>ZINC00285354</b> : 2-phenoxy-N-piperonyl-benzamide	-7,3
10	<b>ZINC11664293</b> : N-[(1R)-1-(5-methyl-1H-benzimidazol-2-yl)propyl]-5-phenyl-1,2,4-triazin-3-amine	-7,3
11	<b>ZINC00275854</b> : 4-amino-N-[(E)-[5-(3-chlorophenyl)-2-furyl]methyleneamino]furazan-3-carboxamide	-7,3
12	<b>ZINC65371536</b> : 6-[3-[(1R)-1-pyrrolidin-1-ylethyl]phenyl]-1H-quinazoline-2,4-dione	-7,3
13	<b>ZINC65371535</b> : 6-[3-[(1S)-1-pyrrolidin-1-ylethyl]phenyl]-1H-quinazoline-2,4-dione	-7,3
14	<b>ZINC13468142</b> : 2,6-bis(4-methoxyphenyl)-3-methyltetrahydropyridin-4(1H)-one oxime	-7,3
15	<b>ZINC65373964</b> : N-[[[(3S)-3-(4-fluorophenyl)tetrahydrofuran-3-yl]methyl]-2,6-dimethyl-pyrimidine-4-carboxamide	-7,3

Fonte: Elaborado pela autora. Na primeira coluna é mostrada uma numeração do composto, na segunda são mostrados o código da molécula no banco de dados Zinc12 (Zinc ID) com a sua nomenclatura IUPAC e na terceira a energia de ligação.

## 4.2 Análise dos principais candidatos

A tabela 3 detalha as propriedades químicas dos dois candidatos selecionados a partir da energia de ligação do *docking*, incluindo todos os critérios utilizados na prospecção da biblioteca química. Ambas as moléculas apresentam peso molecular e área de superfície polar muito semelhantes e são neutros em pH fisiológico (7,4). Porém, o ligante 2 apresenta mais possibilidades de formação de ligações de hidrogênio, portanto, mais solúvel em água. Este também possui mais ligações rotáveis que o ligante 1, tornando-se mais flexível.

As estruturas químicas dos dois ligantes são mostradas na figura 7. Elas foram didaticamente divididas de acordo com os grupamentos químicos presentes para auxiliar nas análises posteriores. No ligante 1, a região i corresponde à um anel benzimidazol, a região ii à oxoquinolona e a região iii à um grupamento acetamida. Já no ligante 2, a região i contém um metoxi-benzimidazolmetil, a região ii contém um grupamento carboxamida e a região iii uma dioxopirimidina. Em ambas as estruturas são observados átomos eletronegativos, como oxigênio e nitrogênio, e anéis carbônicos unitários ou fusionados. Alguns outros pontos de semelhança estrutural podem ser destacados. A região i de cada um dos ligantes apresenta um anel benzimidazol, sendo que no ligante 2 ele encontra-se adicionado de grupamentos metoxi e metil. Os grupamentos acetamida, na região iii do ligante 1, e carboxamida, na região iii do ligante 2, diferem apenas por uma metila. Porém, um encontra-se na porção central do ligante enquanto o outro está numa porção terminal. O mapa de densidade eletrônica (figura 8) de cada um dos ligantes está representado ao lado da sua estrutura, em que a cor verde significa neutralidade e as cores azul e vermelha significam baixa densidade eletrônica e alta densidade eletrônica, respectivamente.

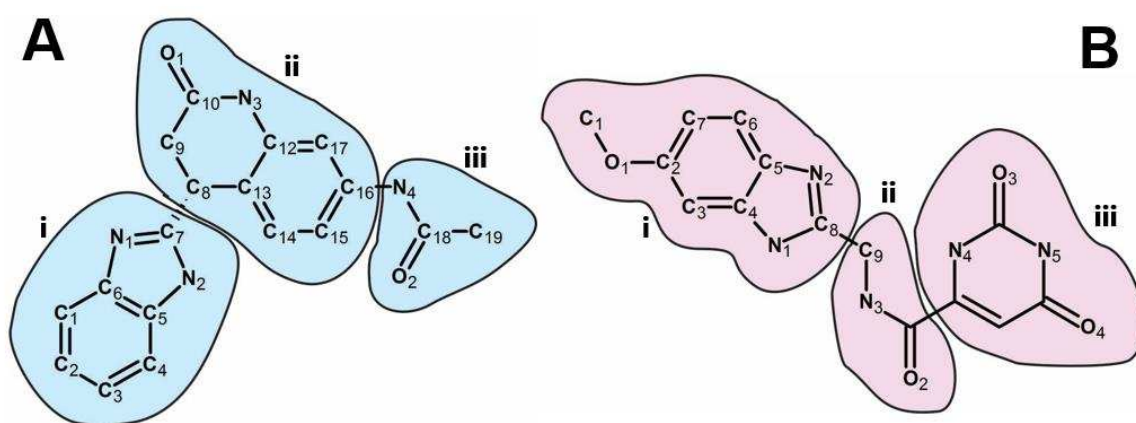
Com o intuito de verificar a existência de atividades biológicas já descritas para estes compostos, foi feita uma busca no ChEMBL, um banco de dados de moléculas bioativas com características de drogas manualmente curado (BENTO et al, 2014). Os dados são extraídos da literatura, curados e padronizados. Através dele, é possível pesquisar por um composto específico e descobrir se alguma atividade biológica já foi previamente reportada para ele. Nenhuma atividade foi encontrada para os ligantes em estudo, mostrando que estes permanecem praticamente inexplorados até o momento.

Tabela 3: Propriedades químicas dos dois candidatos principais.

Candidato	Peso molecular (g/mol)	Doador de Lig-H	Aceptor de Lig-H	Área de superfície polar (Å <sup>2</sup> )	Carga global	Ligações rotáveis
LIG1	320,352	3	6	-15,68	0	2
LIG2	315,289	4	9	-14,44	0	4

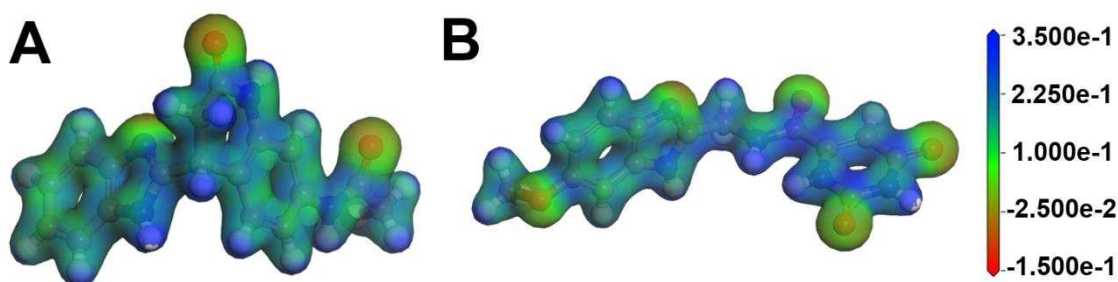
Fonte: Elaborado pela autora. Na primeira coluna está a identificação do ligante, seguida pelo peso molecular, número de doadores de ligação de hidrogênio, número de aceptores de ligação de hidrogênio, área de superfície polar, carga global e número de ligações rotáveis.

Figura 7: Estrutura química dos ligantes.



Fonte: Elaborado pela autora. Estrutura química mostrando a numeração dos átomos e divisão em regiões. No ligante 1 (A), a região i corresponde à um anel benzimidazol, a região ii à oxoquinolona e a região iii à um grupamento acetamida. Já no ligante 2 (B), a região i contém um metoxibenzimidazolmetil, a região ii contém um grupamento carboxamida e a região iii uma dioxopirimidina.

Figura 8: Mapa de densidade eletrônica de cada um dos ligantes.

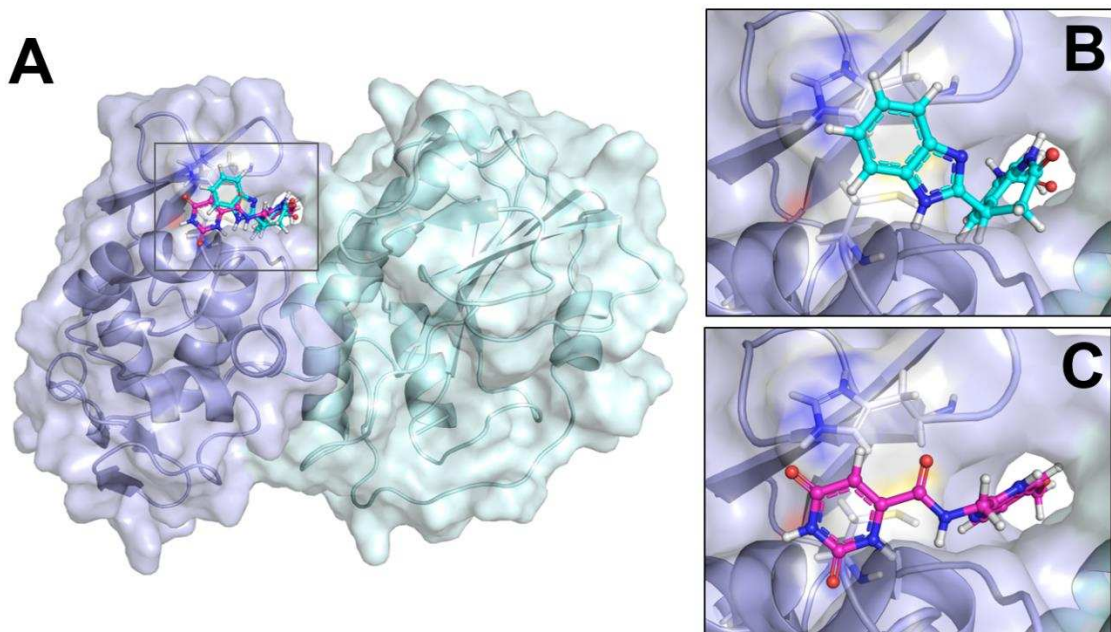


Fonte: Elaborado pela autora. Mapas de densidade eletrônica dos ligantes 1 (A) e 2 (B), com alta densidade mostrada em azul e baixa em vermelho.

### 4.2.1 Docking molecular

A figura 9 mostra as poses de menor energia do *docking* de cada um dos ligantes realizado com o *software* Vina (TROTT & OLSON, 2009). É possível observar uma boa acomodação das moléculas no bolso catalítico da nsP2. Ambos ligantes ocuparam posições semelhantes no sítio catalítico da proteína, estando bem próximos da díade catalítica Cys1013-His1083 (STRAUSS et al., 1992), representada em bastão. Todavia, um fato interessante observado é que a região i de cada ligante, que apresentam ambas um anel benzimidazol, se posicionaram em orientações opostas. O hidrogênio ligado ao N2 na região i de LIG1 e o hidrogênio ligado ao N3 na região ii de LIG2 assumiram posição e orientação muito semelhante, indicando a presença de uma interação importante nesta região para o encaixe de moléculas. Apesar do ligante 2 ser mais flexível, este assumiu uma posição estendida no sítio de ligação.

Figura 9: Representação da proteína nsP2 complexada com os ligantes 1 e 2 na pose de menor energia do *docking*.

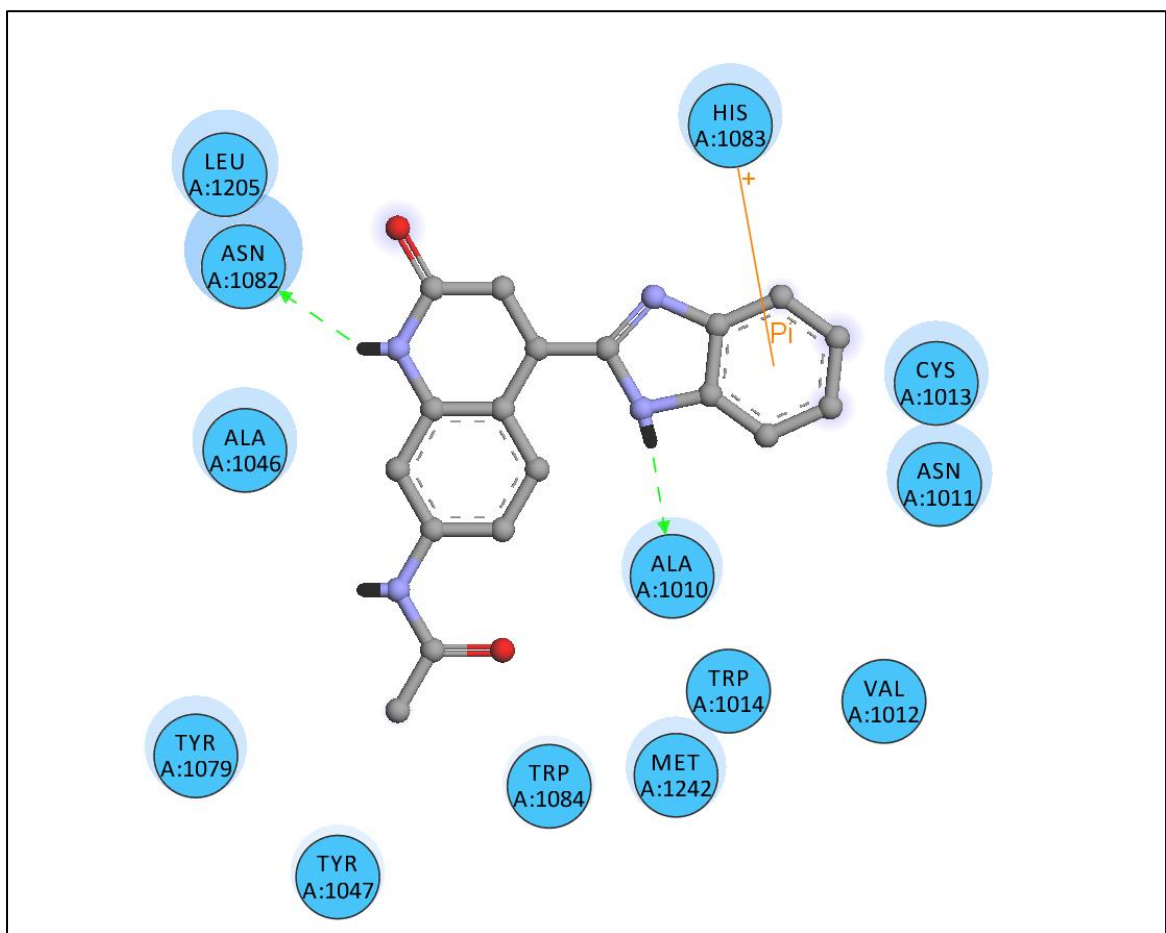


Fonte: Elaborado pela autora. Visão geral da proteína nsP2 com os dois ligantes sobrepostos posicionados no sítio (A) com a aproximação do ligante 1 (B) e 2 (C). A proteína é representada em *cartoon*, os resíduos catalíticos são representados em bastão e os ligantes são representados em bola e bastão.

No diagrama 2D das poses de interação dos ligantes com a nsP2 (figuras 10 e 11) estão representados todos os resíduos em contato com cada

ligante no seu sítio, bem como as interações formadas. Além da Cys1013 e da His1083, os resíduos Ala1010, Asn1011, Val1012, Cys1013, Trp1014, Ala1046, Tyr1047, Tyr1079, Asn1082, His1083, Leu1205 e Met1242 também estão presentes nos sítios de ligação para ambos os ligantes. A maioria destes resíduos coincidem com aqueles encontrados por DHINDWAL et al. (2016) no sítio de ligação de um peptídeo correspondente ao sítio de clivagem nsP2/3 por meio de *docking* molecular. A única diferença entre os resíduos em contato próximo com cada um dos ligantes é a presença da Lys1016 no sítio de ligação do ligante 2. Uma interação deste resíduo com uma tirosina presente em uma das sequências alvo de clivagem da nsP2 é apontada por influenciar a afinidade da proteína pela sequência específica (RUSSO et al., 2010). Ainda através do diagrama 2D, é possível observar que os hidrogênios ligados à N2 (região i de LIG1) e N3 (região ii de LIG2) citados anteriormente fazem a mesma interação com o esqueleto peptídico da Ala1010.

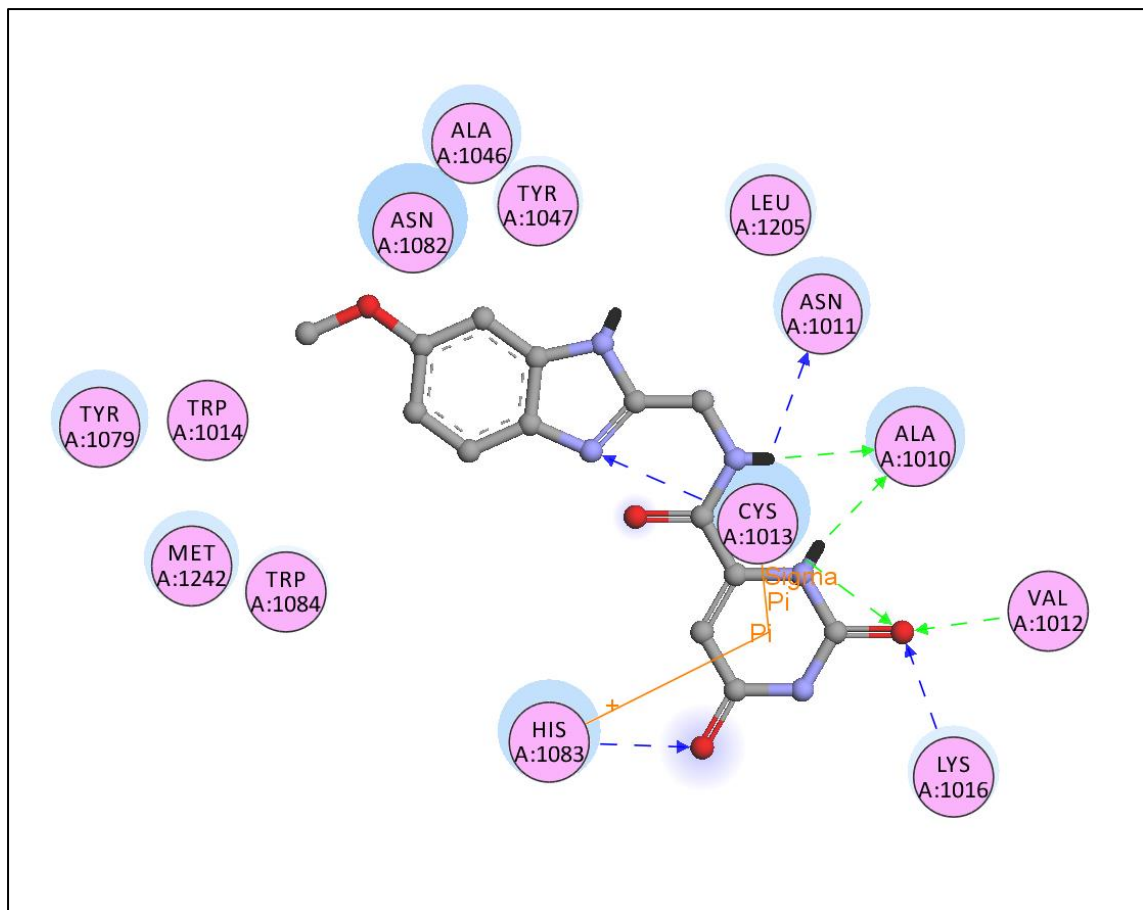
Figura 10: Representação 2D das interações proteína-ligante para o complexo nsP2-LIG1.



Fonte: Elaborado pela autora. As setas tracejadas verdes indicam ligação de hidrogênio com o esqueleto peptídico do aminoácido e a linha laranja indica interação  $\pi$ .

De um modo geral, o diagrama o LIG2 apresentou muito mais interações com a proteína do que o de LIG1. As interações no complexo nsP2-LIG1 compreendem duas ligações de hidrogênio (Ala1010 e Asn1082) e uma interação  $\pi$ -cátion com a His1083. A interação  $\pi$ -cátion dos ligantes com a His catalítica pode ser importante na inibição da atividade pois o resíduo de histidina carregado positivamente é necessário para iniciar a formação do par iônico com o grupo tiol da Cys1013 que é a base do mecanismo catalítico (POLGAR 1974). No complexo nsP2-LIG2, além desta interação  $\pi$ -cátion com a His1083, também são observadas uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com a Cys1013 e ligações de hidrogênio com as cadeias laterais de Asn1011, Cys1013, Lys16 e His1083 e com os esqueletos peptídicos de Ala1010 e Val1012. A maioria destas interações concentram-se nas regiões ii e iii do ligante, sendo apenas uma delas com a região i. As observações feitas no *docking* molecular traduzem um encaixe favorável entre duas moléculas. No entanto, é necessário avaliar a estabilidade destas interações em meio biológico.

Figura 11: Representação 2D das interações proteína-ligante para o complexo nsP2-LIG2.



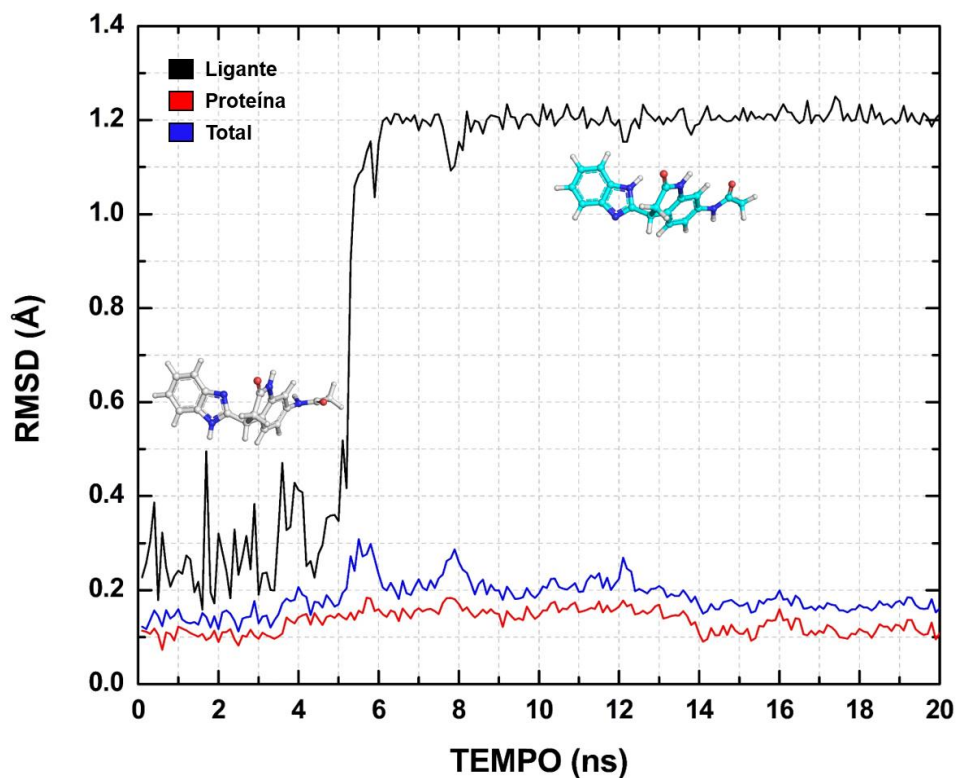
Fonte: Elaborado pela autora. As setas tracejadas verdes indicam ligação de hidrogênio com o esqueleto peptídico do aminoácido, azuis com a cadeia lateral e a linha laranja indica interação  $\pi$ .

#### **4.2.2 Dinâmica molecular**

As variações de RMSD ao longo do tempo de simulação dos complexos nsP2-LIG1 e nsP2-LIG2 são mostradas nas figuras 12 e 13, respectivamente. Tanto o RMSD total (linha azul), ou seja, considerando-se as variações tanto do ligante como da proteína, quanto o RMSD da proteína (linha vermelha) permaneceu muito estável durante as duas simulações. Este comportamento se deve, em grande parte, ao fato de que somente os resíduos próximos na interação foram deixados livres e todos os outros resíduos mais distantes foram fixados. Assim, é importante analisar o RMSD dos ligantes separadamente de modo a fazer uma observação mais fidedigna das variações conformacionais que ocorreram na simulação.

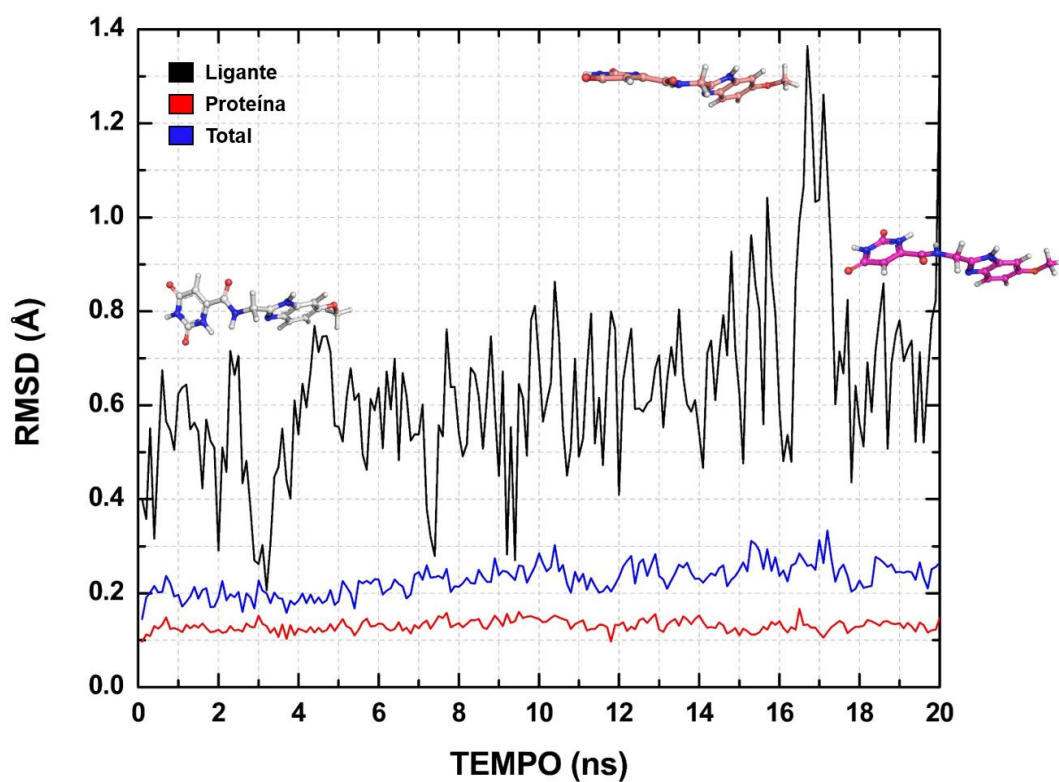
Aproximadamente no tempo de 6 ns de simulação de LIG1, é possível observar que houve uma grande mudança na posição do ligante, seguida de alta estabilidade até o final da simulação em 20 ns com quase nenhuma variação nas posições atômicas. Esta variação de RMSD em 6 ns corresponde à uma importante torção de aproximadamente 180° na região i do ligante. No gráfico de RMSD do LIG1 (figura 12) estão representadas as posições inicial e final do ligante, sendo possível observar a diferença na orientação do anel benzimidazol. Contrariamente, o LIG2 apresentou alta variação de RMSD ao longo da dinâmica, não tendo sido possível observar a sua estabilização no sítio ativo da nsP2 no tempo de simulação realizado. No tempo de aproximadamente 17 ns, observou-se um pico de variação no RMSD seguido de volta à conformação anterior. No gráfico de RMSD do complexo nsP2-LIG2 (figura 13), além da representação das conformações inicial e final, é mostrada em rosa a conformação correspondente ao tempo de 17 ns.

Figura 12: Variação de RMSD ao longo da simulação de dinâmica molecular para o ligante 1.



Fonte: Elaborado pela autora. Posições inicial e final do ligante representadas no gráfico em visualização bola e bastão.

Figura 13: Variação de RMSD ao longo da simulação de dinâmica molecular para o ligante 2.

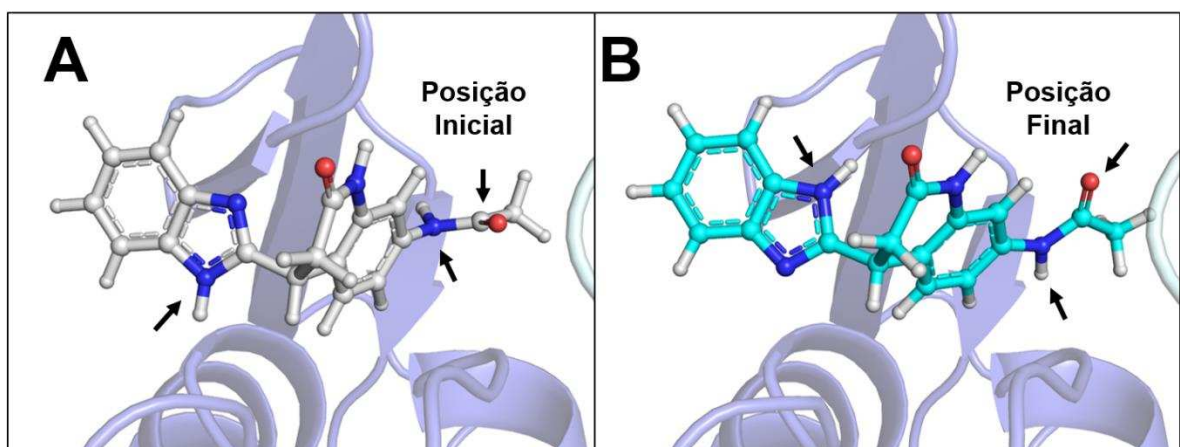


Fonte: Elaborado pela autora. Posições inicial, final e uma intermediária correspondente a 17 ns do ligante representadas no gráfico em visualização bola e bastão.

As mudanças conformacionais ocorridas na simulação de LIG1 comparando-se as posições inicial e final (figura 14) resultaram na formação de novas interações com a proteína. A ausência de variação de RMSD após o grande ajuste ocorrido indica a formação de um complexo estável e aponta para o LIG1 como um candidato promissor para a inibição da protease do vírus Chikungunya. As novas interações formadas na região i do LIG1 são uma ligação de hidrogênio com um resíduo de cisteína na posição 1013 e uma com um resíduo de asparagina na posição 1082. Já na região iii da molécula, o grupamento acetamida aproximou-se do resíduo Trp1047, também com possível formação de ligação de hidrogênio. Isto pode ser observado na figura 15.

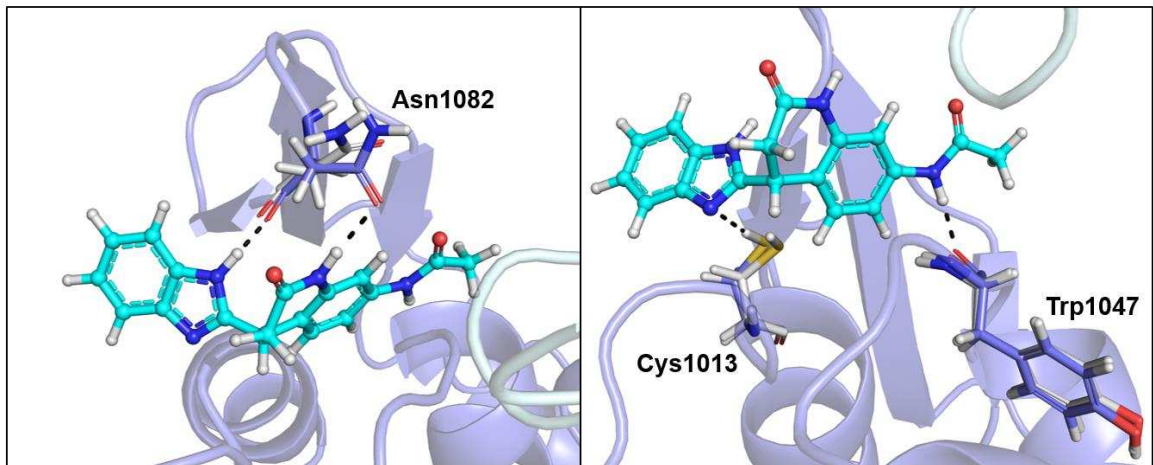
A interação com a Cys1013 é muito importante pois este resíduo é a base do mecanismo catalítico da nsP2 (POLGAR 1974). Não há indicações na literatura de que o resíduo Trp1047 seja requerido para a atividade proteolítica de nsP2. Porém, foi demonstrado que um resíduo de asparagina, que se encontra em posição equivalente ao Trp1047 da nsP2 de Chikungunya, auxilia na orientação do inibidor E64d no sítio ativo da nsP2 de VEEV (Hu et al. 2016). A interação com Asp1012, adjacente ao resíduo catalítico His1083 (STRAUSS et al., 1992), pode ser importante no bloqueio do acesso a este resíduo.

Figura 14: Comparação entre as posições inicial e final do ligante 1 na dinâmica molecular.



Fonte: Elaborado pela autora. Na figura são representadas a posição inicial (A) e final (B) do ligante na simulação de dinâmica molecular. O ligante está representado em bola e bastão e a proteína em *cartoon*. As setas destacam ajustes conformacionais observados.

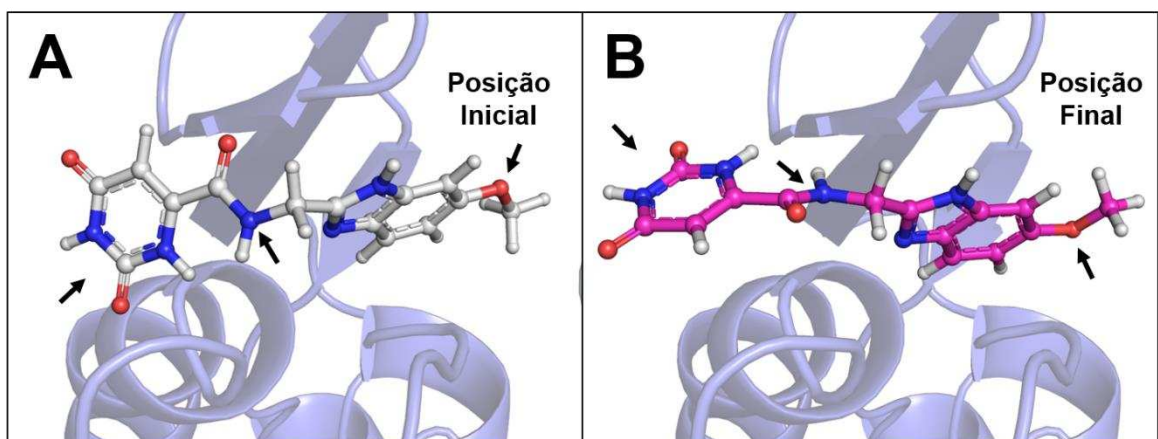
Figura 15: Formação de interações entre o ligante 1 e resíduos próximos ao final da dinâmica.



Fonte: Elaborado pela autora. As linhas tracejadas indicam as posições das ligações de hidrogênio formadas.

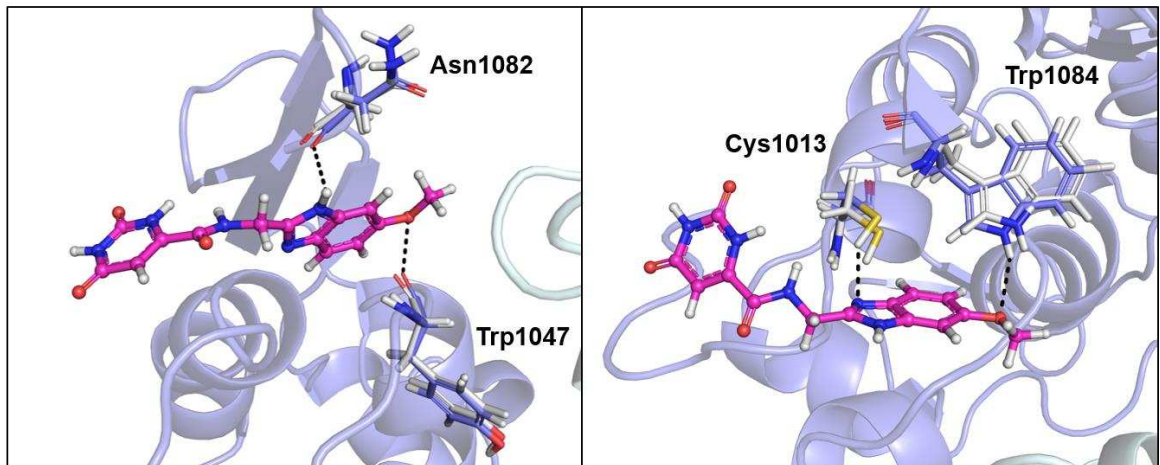
Comparando-se as posições inicial e final do complexo nsP2-LIG2 (figura 16), é possível observar uma mudança de posição nas regiões i e ii do ligante, juntamente com uma aproximação do resíduo catalítico His1083 e possível formação de ligação de hidrogênio do resíduo com cada uma das regiões. De modo semelhante, também ocorre uma modificação no posicionamento da região iii e aproximação do Trp1084 com formação de ligação de hidrogênio. As novas interações formadas podem ser observadas na figura 17.

Figura 16: Comparação entre as posições inicial e final do ligante 2 na dinâmica molecular.



Fonte: Elaborado pela autora. Na figura são representadas a posição inicial (A) e final (B) do ligante na simulação de dinâmica molecular. O ligante está representado em bola e bastão e a proteína em *cartoon*. As setas destacam ajustes conformacionais observados.

Figura 17: Formação de interações entre o ligante 2 e resíduos próximos ao final da dinâmica.

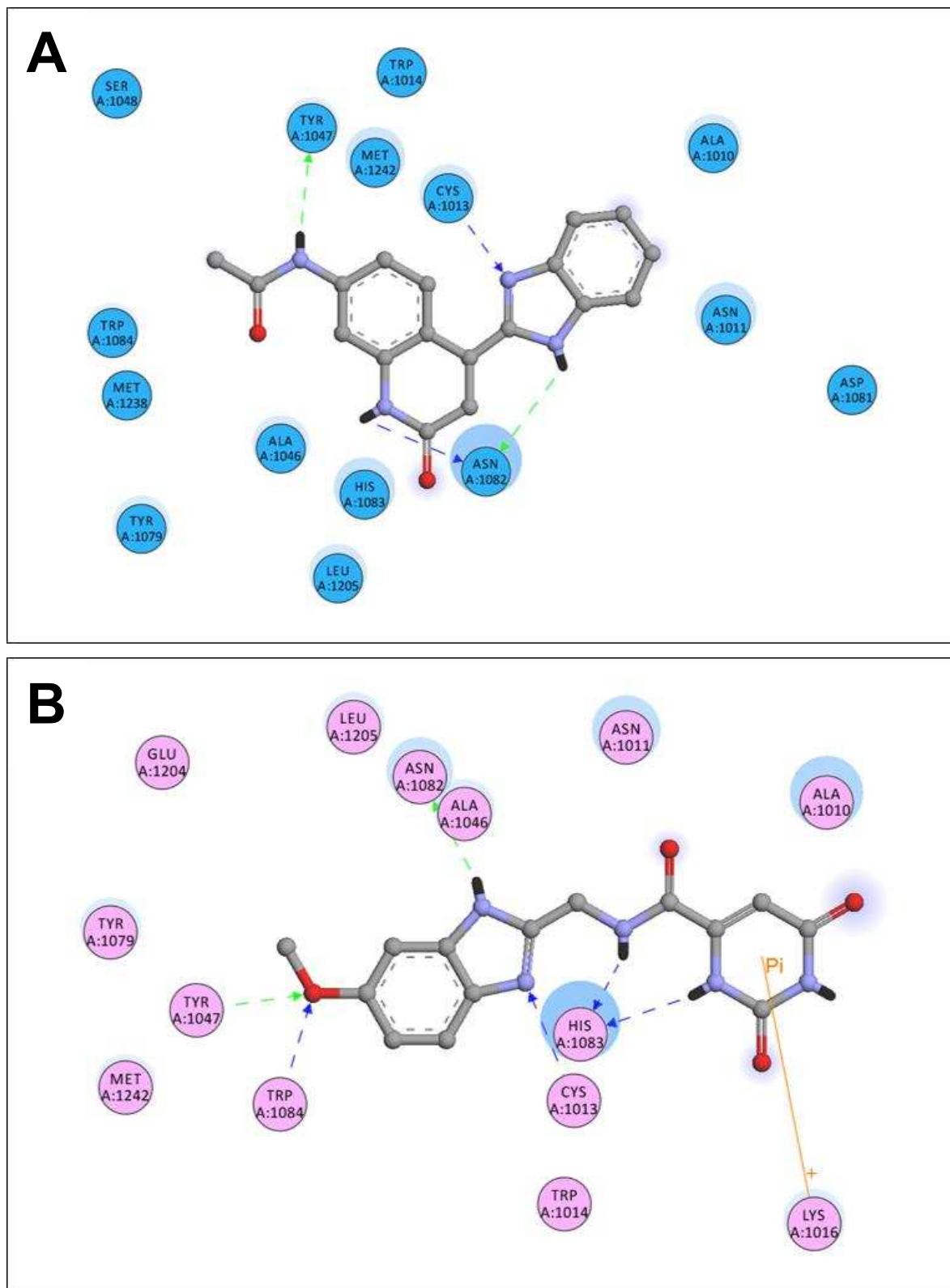


Fonte: Elaborado pela autora. As linhas tracejadas indicam a posição das ligações de hidrogênio formadas.

Em diversas outras proteases da família papaína, encontram-se aminoácidos de cadeia lateral pequena na posterior à histidina catalítica, como glicina ou alanina. Já nas proteases de alfavírus, é observado um resíduo de triptofano conservado entre elas. Assim, a interação de potenciais inibidores com este resíduo pode apresentar um fator de seletividade para proteases alfavirais. Além disso, Strauss et al. (1992) demonstraram que este resíduo é requerido para a atividade catalítica da nsP2 de SINV.

De um modo geral, foram observadas a formação de muito mais interações de LIG2 no sítio ativo da proteína do que de LIG1. O diagrama 2D das interações (figura 18) permite observar este padrão. Porém, como neste ponto o sistema ainda está passando por ajustes conformacionais, não é possível determinar se estas interações serão mantidas. Ao comparar o diagrama 2D de interação da posição final da dinâmica do complexo nsP2-LIG1 com o diagrama 2D da pose de *docking*, nota-se o aumento no número de interações.

Figura 18: Diagrama 2D das interações presentes ao final da dinâmica dos complexos nsP2-LIG1 (A) e nsP2-LIG2 (B).



Fonte: Elaborado pela autora. As setas tracejadas verdes indicam ligação de hidrogênio com o esqueleto peptídico do aminoácido, azuis com a cadeia lateral e a linha laranja indica interação  $\pi$ .

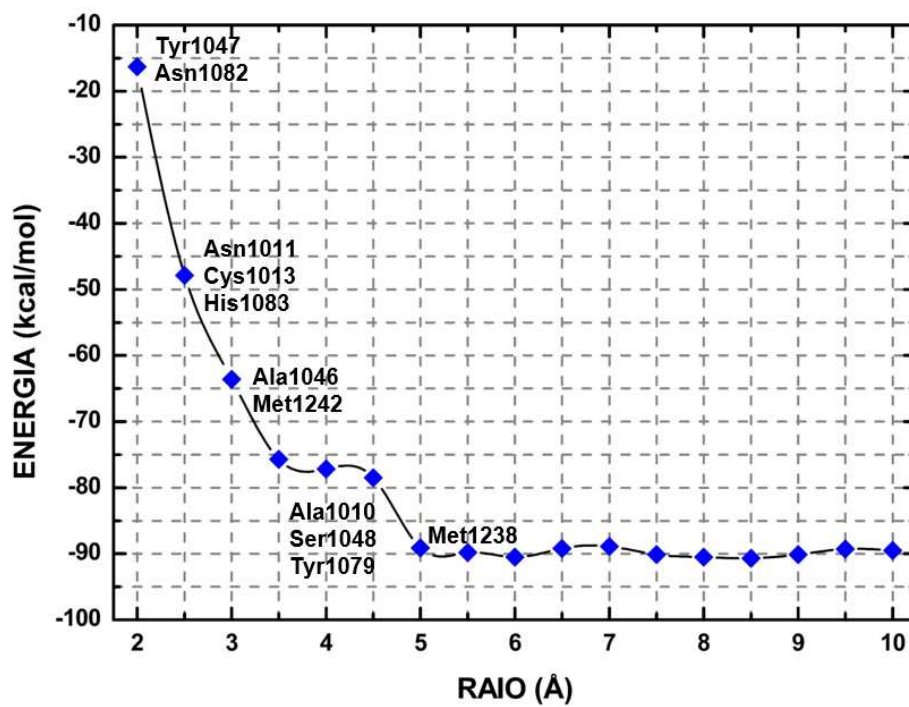
### **4.2.3 Cálculo quântico da energia de interação**

Cálculos quânticos de interação representam uma ferramenta atrativa para a descrição de interações presentes em sistemas biológicos por conta da sua alta acurácia (RAHA, 2007; ZHOU, 2010). Apesar da complexidade destes sistemas representar uma limitação à aplicação desse tipo de cálculo, a simplificação realizada por meio da metodologia de fragmentação molecular com capas conjugadas permite analisar a nível quântico a interação entre um ligante e um receptor proteico através do cálculo das contribuições energéticas individuais de cada resíduo dentro de um raio traçado a partir do ligante. No contexto do desenvolvimento de novas drogas com ação em alvos proteicos específicos, permite identificar os pontos mais fortes e mais fracos de interação. Este conhecimento pode então ser aplicado para sugerir modificações estruturais em um dado ligante de modo a aumentar a energia de interação dele com o alvo nos pontos fracos identificados mantendo-se as interações nos pontos fortes.

Devido ao fato de a interação de LIG2 com a nsP2 não ter sido estabilizada no tempo de simulação de dinâmica molecular realizado, o cálculo quântico da energia de interação foi realizado somente para o complexo nsP2-LIG1. A realização de simulações de dinâmica molecular até a estabilização do complexo nsP2-LIG2 seguida da avaliação quântica da energia de interação é uma perspectiva para trabalhos futuros. Para a análise da interação nsP2-LIG1, foram considerados os resíduos presentes dentro de um raio de 10 Å traçado a partir do ligante, totalizando 53 resíduos no estudo.

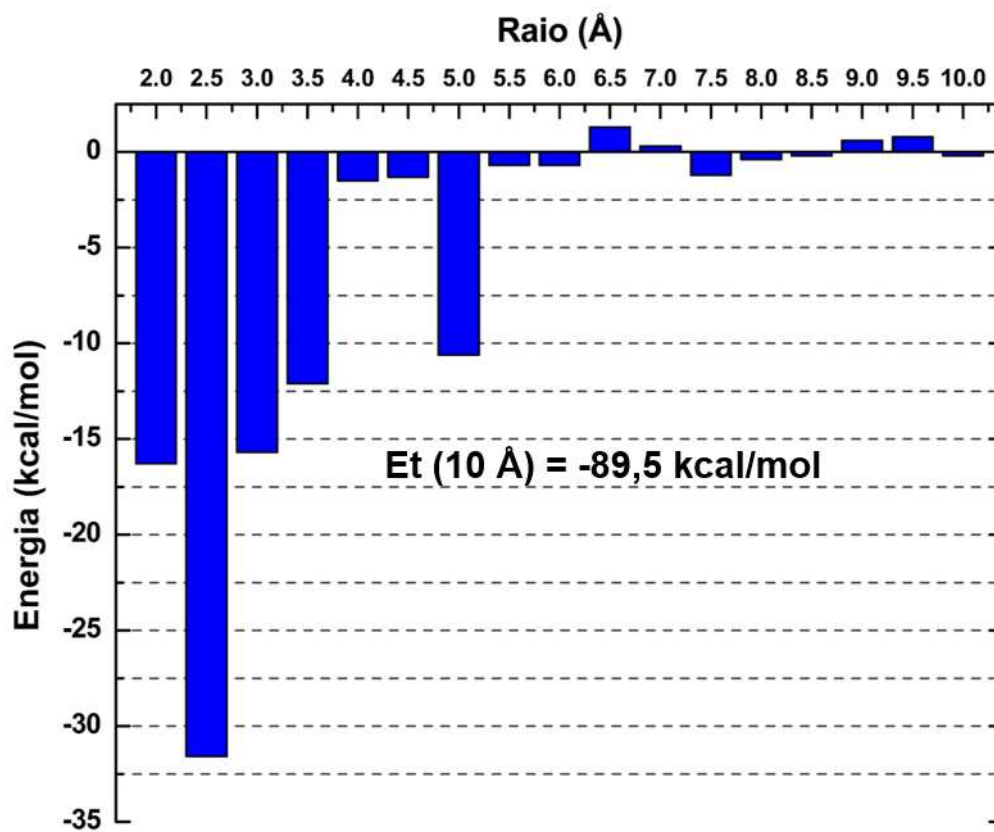
O somatório das energias de interação individuais dos resíduos permite a análise do sistema como um todo. Na evolução da energia total do sistema (figura 19), observa-se um grande aumento de energia no raio de 2,0 a 2,5 Å e quase toda a energia de interação do sistema está concentrada nos resíduos até 3,5 Å de distância do ligante. Entre os raios 3,5 e 4,5 Å é observada uma breve estabilização e, à medida que o raio aumenta de 4,5 para 5,0 Å, há um novo incremento de energia causado exclusivamente pelo resíduo Met1238. No raio de interação de 10,0 Å, a energia total calculada para o sistema nsP2-LIG1 foi de - 89,5 kcal/mol.

Figura 19: Evolução da energia total de interação do sistema no raio crescente de interação.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 20: Incrementos na energia total do sistema por raio de interação.



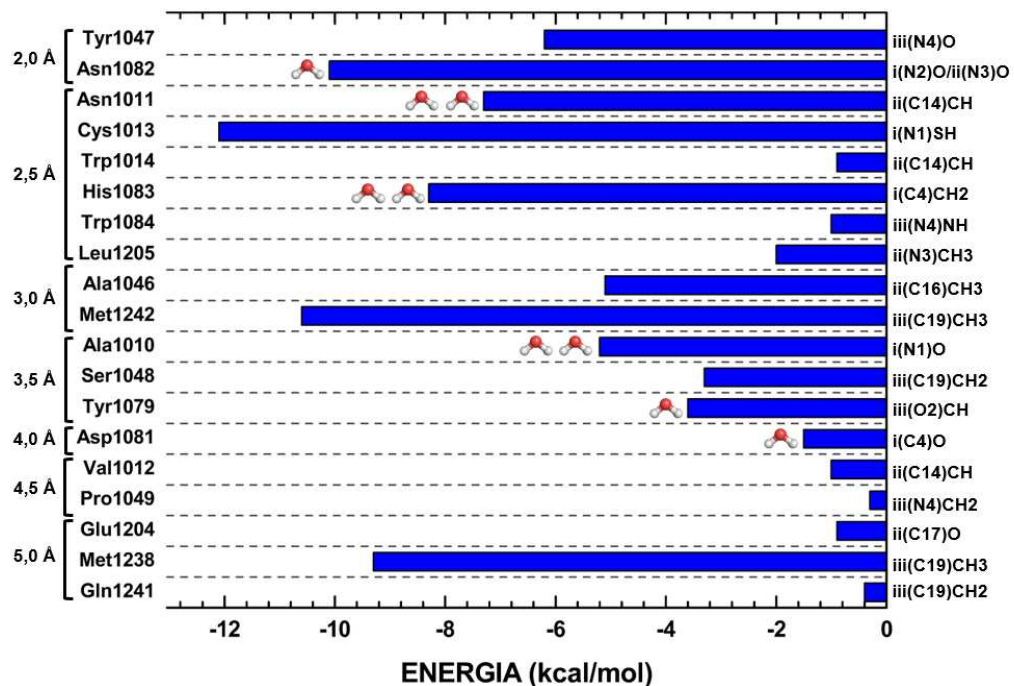
Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 20 mostra o somatório das energias individuais de todos os resíduos dentro de cada raio de interação. Observa-se, mais uma vez, que os resíduos que se encontram mais próximo do ligante, especialmente aqueles até 3,5 Å de distância, são responsáveis pelas maiores contribuições de energia. Este comportamento é esperado, já que o afastamento dos átomos elimina a possibilidade de formação de interações intermoleculares como ligações de hidrogênio ou interações de van der Waals, que são fundamentais na estabilização desse tipo de sistema. Nota-se que a maior contribuição energética vem dos resíduos dentro do raio de 2,0 a 2,5 Å, totalizando quase o dobro da energia do segundo raio com maior contribuição. É neste raio que estão presentes resíduos importantes como a Cys1013 (-12,1 kcal/mol) e a His1083 (-8,3 kcal/mol), que formam a díade catalítica da nsP2. A partir do raio 5,0 Å, incrementos grandes de energia deixam de ser observados no sistema. Assim, esse raio é considerado como o ponto de convergência da energia.

O painel BIRD (figura 21) mostra todos os resíduos presentes até o ponto de convergência do sistema, no raio de interação de 5 Å a partir do ligante. Na figura estão indicados o resíduo, sua energia, o raio de interação em que se encontra, a indicação da presença de moléculas de água mediando a interação e a região do ligante mais próxima do resíduo. Durante a dinâmica molecular de nsP2-LIG1, ocorreram ajustes conformacionais na posição do ligante, levando ao estabelecimento de interações com o sítio de ligação na proteína que auxiliaram na estabilização do complexo. Dentre estes ajustes, foram destacadas a rotação da região i, que assumiu uma posição favorável para a formação de ligações de hidrogênio com os resíduos Cys1013 e Asn1082, e a aproximação da região iii ao Tyr1047, entrando em distância e orientação favorável ao estabelecimento de ligação de hidrogênio com este resíduo. A importância energética dos três resíduos citados para a interação nsP2-LIG1 pode ser comprovada através do cálculo quântico, tendo sido a energia de interação calculada para Cys1013 -12,1 kcal/mol, para Tyr1047 -6,2 kcal/mol e para Asn1082 -10,1 kcal/mol. Observa-se que os resíduos mais próximos do ligante, de modo geral com até 3,5 Å de distância, apresentam energia de ligação mais fortes, com exceção da Met1238 no raio 5,0 Å que apresentou energia de -9,3 kcal/mol. Além dos já citados, outros resíduos próximos que também merecem destaque pela sua contribuição na estabilização

de sistema são Asn1011 (-7,3 kcal/mol), Ala1046 (-5,1 kcal/mol), Met1242 (-10,6 kcal/mol), Ala1010 (-5,2 kcal/mol), Ser1048 (-3,3 kcal/mol), Tyr1079 (-3,6 kcal/mol) e His1083 (-8,3 kcal/mol), totalizando 11 resíduos os quais estão representados na figura 22. Nota-se no BIRD a presença de 5 resíduos (Glu1204, Leu1205, Met1238, Gln1241 e Met1242) pertencentes ao domínio N-terminal da nsP2, responsável por outras atividades enzimáticas como helicase. Isto se deve ao posicionamento do sítio proteolítico próximo à interface entre os dois domínios.

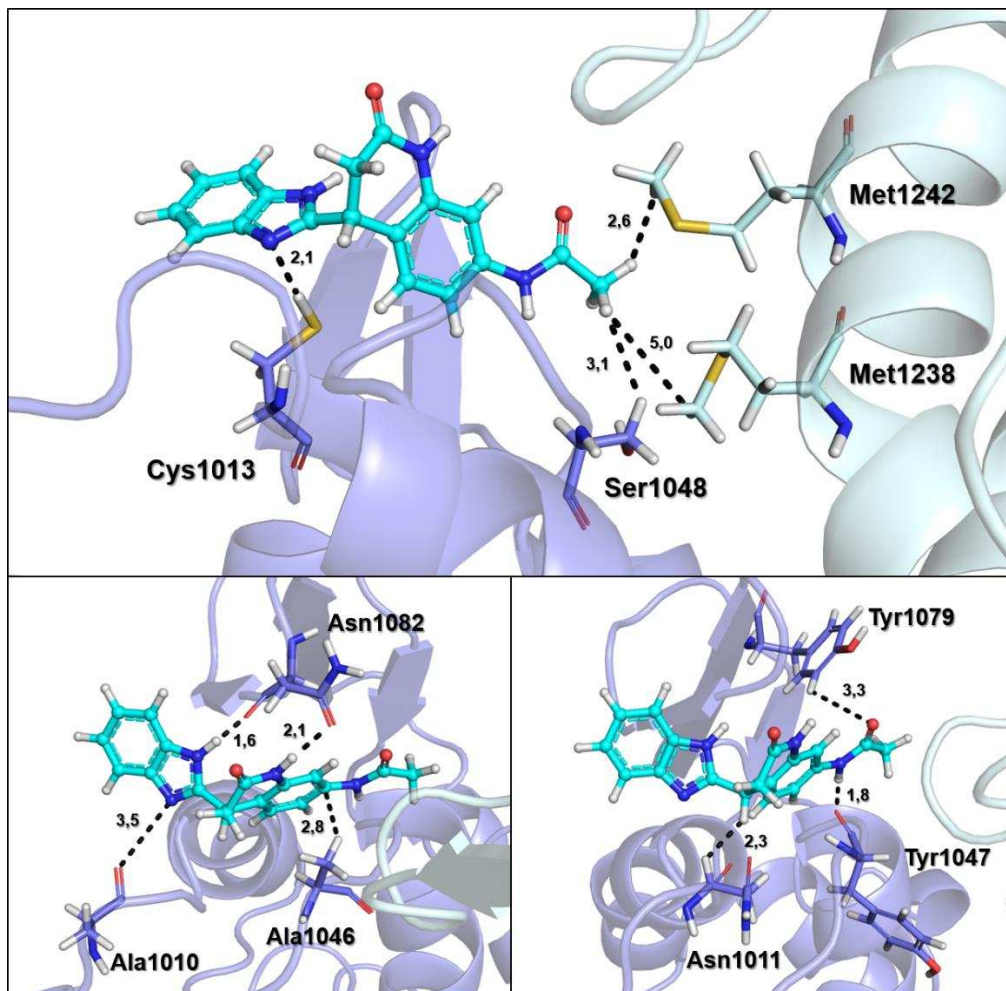
Figura 21: Painel BIRD contendo os resíduos dentro do raio de interação de 5 Å a partir do ligante.



Fonte: Elaborado pela autora.

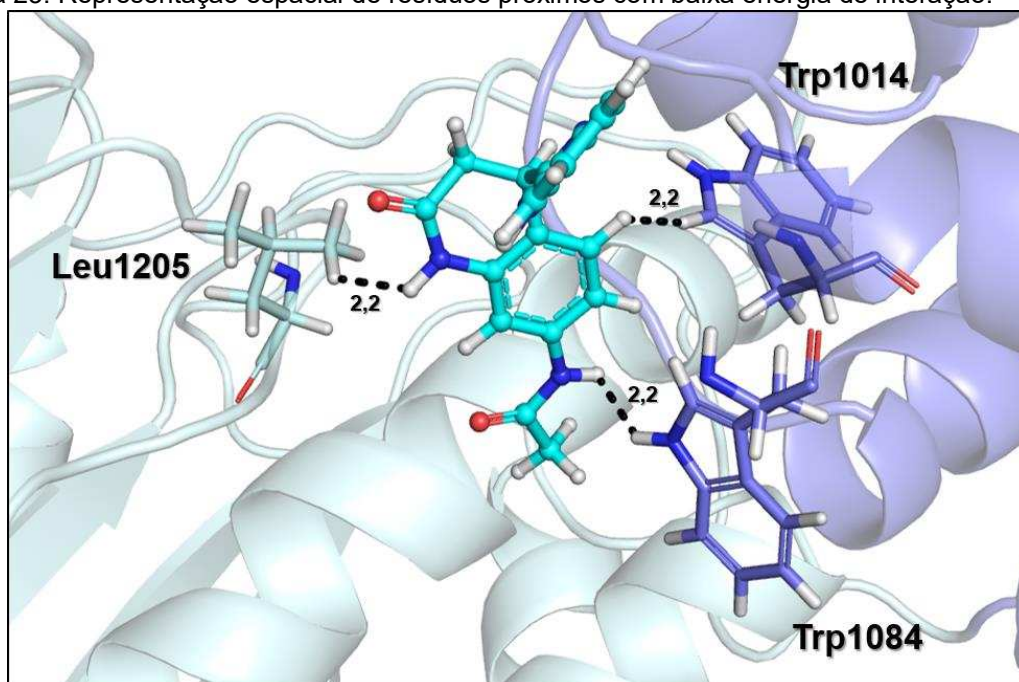
É importante observar não somente os resíduos de maior importância para a interação, mas também aqueles que, mesmo estando próximo ao ligante, não apresentam energia de interação relevante. A partir do painel BIRD é possível identificar resíduos dentro do raio de convergência com contribuição energética muito baixa. Dentre eles, destacam-se os resíduos Trp1014 (-0,9 kcal/mol), Trp1084 (-1,0 kcal/mol) e Leu1205 (-2,0 kcal/mol), que estão dentro de um raio muito próximo do ligante (2,5 Å). Como o objetivo do trabalho é desenvolver moléculas que interajam com alta afinidade no sítio enzimático, estes resíduos são importantes alvos para o desenho racional de modificações nos ligantes candidatos que possam aumentar a quantidade de interações deles com a proteína. O posicionamento destes resíduos está representado na figura 23.

Figura 22: Representação espacial dos resíduos mais relevantes para a energia do sistema.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 23: Representação espacial de resíduos próximos com baixa energia de interação.



Fonte: Elaborado pela autora.

## CONCLUSÕES

O *virtual screening* demonstrou ser uma estratégia de alto rendimento que permitiu a seleção de potenciais candidatos a inibidores do sítio proteolítico da proteína não-estrutural 2 (nsP2) do vírus Chikungunya a partir de uma grande biblioteca de compostos químicos. Esta metodologia apresenta elevado potencial para ser utilizada como uma pré-seleção de composto a serem testados *in vitro* e *in vivo*, aumentando assim as chances de sucesso na busca de novas drogas.

Dois candidatos (ZINC67460397, denominado LIG1, e ZINC67513969, denominado LIG2) puderam ser selecionados para análises a partir do *screening*, apresentando energia de ligação do *docking* de - 7,8 kcal/mol. Apesar da energia de ligação idêntica, apenas o LIG1 se estabilizou no sítio ativo de nsP2 durante simulação de dinâmica molecular, apresentando uma mudança conformacional importante que levou ao estabelecimento das interações-chave responsáveis pela estabilização.

A interação de LIG1 com a nsP2 foi avaliada por meio de mecânica quântica. Dentre todos os resíduos analisados, os que apresentaram maior contribuição foram Cys1013, Tyr1047, Asn1082, Met1238, Asn1011, Ala1046, Met1242, Ala1010, Ser1048, Tyr1079 e His1083. Nota-se que os resíduos catalíticos Cys1013 e His1083 estão entre os mais importantes para a interação, sendo que Cys1013 apresentou a maior energia de interação do sistema. Além deles, destacam-se os resíduos Tyr1047 e Asn1082, que estabeleceram importantes interações com LIG1 após a dinâmica.

A energia total de ligação calculada até o raio de 10 Å de interação foi de - 89,5 kcal/mol. Os resultados obtidos mostram que LIG1 é um bom candidato à inibição da proteína nsP2, com forte energia de ligação. Os dados apresentados neste trabalho formam um ponto de partida para o desenvolvimento de inibidores da nsP2 de Chikungunya, indicando ZINC67460397 como uma molécula promissora.

## PERSPECTIVAS

Realizar a dinâmica molecular do LIG2 até a sua estabilização, para então fazer a análise da energia de interação do complexo a nível quântico.

Avaliar a interação de LIG1 com proteases humanas pertencentes à família *papain-like*, como as calpaínas e as catepsinas, para investigar possíveis ações em alvos indesejados.

Expandir a análise do *screening* avaliando-se mais compostos obtidos aplicando o mesmo protocolo proposto (dinâmica molecular e mecânica quântica) para que se possa realizar um novo ranqueamento destes candidatos a partir de informações mais detalhadas.

## REFERÊNCIAS

- BHAKAT S., KARUBIU W., JAYAPRAKASH V., SOLIMAN M. E. A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses. **Eur J Med Chem.** v. 87, p. 677-702, 2014.
- BROOKS, B. R.; BROOK, C. L.; MACKERELL, A. D.; NILSSON, L.; PETRELLA, R. J.; ROUX, B.; WON, Y.; ARCHONTIS, G.; BARTELS, C.; BORESCH, S.; CAFLISCH, A.; CAVES, L.; CUI, Q.; DINNER, A. R.; FEIG, M.; FISCHER, S.; GAO, J.; HODOSCEK, M.; IM, W.; KUCZERA, K.; LAZARIDIS, T.; MA, J.; OVCHINNIKOV, V.; PACI, E.; PASTOR, R. W.; POST, C. B.; PU, J. Z.; SCHAEFER, M.; TIDOR, B.; VENABLE, R. M.; WOODCOCK, H. L.; WU, X.; YANG, W.; YORK, D. M.; KARPLUS, M. CHARMM: The Biomolecular simulation Program, **J. Comp. Chem.** v. 30, p. 1545-1615, 2009.
- BROWN, R. S.; WAN, J. J.; KIELIAN, M. The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. **Viruses.** v. 10, n. 89, 2018.
- BYLER K. G., COLLINS J. T., OGUNGBE I. V., SETZER W. N. Alphavirus protease inhibitors from natural sources: A homology modeling and molecular docking investigation. **Comput Biol Chem.** v. 64, p.163-184, 2016.
- CASSELL, S.; EDWARDS, J.; BROWN, D. T. Effects of lysosomotropic weak bases on infection of BHK-21 cells by sindbis virus. **J. Virol.** v. 52, p. 857– 864, 1984.
- COOMBS, K.; MANN, E.; EDWARDS, J.; BROWN, D. T. Effects of chloroquine and cytochalasin B on the infection of cells by sindbis virus and vesicular stomatitis virus. **J. Virol.** v. 37, p. 1060-1065, 1981.
- CUNHA, R. V. D.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 112, n. 8, p. 523-531, 2017.
- DAS, P. K.; PUUSEPP, L.; VARGHESE, F. S.; UTT, A.; AHOLA, T.; KANANOVICH, D. G.; LOPP, M.; MERITS, A.; KARELSON, M. Design and Validation of Novel Chikungunya Virus Protease Inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 60, n. 12, p. 7382-7395, 2016.
- DAS, P. K.; PUUSEPP, L.; VARGHESE, F. S.; UTT, A.; AHOLA, T.; KANANOVICH, D. G.; LOPP, M.; MERITS, A.; KARELSON, M. Design and Validation of Novel Chikungunya Virus Protease Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 60, n. 12, p. 7382-7395, 2016.
- DHINDWAL, S.; KESARI, P.; SINGH, H.; KUMAR, P.; TOMAR, S. Conformer and pharmacophore based identification of peptidomimetic inhibitors of chikungunya virus nsP2 protease. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics.** v. 35, n. 16, p. 3522-3539, 2017.
- DOLINSKY, T.J.; NIELSEN, J. E.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research.** v. 32, p. 665-667, 2004.
- DUPUIS-MAGUIRAGA, L.; Noret, M.; Brun, S.; Le Grand, R.; Gras, G.; Roques, P. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Negl Trop Dis** v. 6, n. 3, 2012.
- ECONOMOPOULOU, A.; DOMINGUEZ, M.; HELYNCK, B.; SISSOKO, D.; WICHMANN, O.; QUENEL, P. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. **Epidemiol Infect.** v. 137, n. 4, p. 534-41, 2009.
- EKHTEIARI, S.R, SERHAT, I.Y, DURDAGI,S.;STEIN, M.; YURTSEVER, M. A QM protein-ligand investigation of antipsychotic drugs with the dopamine D2 Receptor (D2R). **J. Biomol. Struct. Dyn.** p. 1–10, 2017.

- BURT, F. J.; ROLPH, M. S.; RULLI, N. E.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M. T. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, 2012.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Togaviridae. In **Fields Virology**. v. 1, p. 629–650, 2013.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 50, n. 5, p. 583-584, 2017.
- FORLI, S., HUEY, R., PIQUE, M. E., SANNER, M. F., GOODSELL, D. S., & OLSON, A. J. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nature Protocols**, v. 11, p. 905-919, 2016.
- FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses. **Viruses**. v. 8, n. 6, 2016.
- CEDRON M. G.; EHSANI, N.; MIKKOLA, M. L.; GARCIA, J. A.; KAARIAINEN, L. RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. **FEBS Lett**. v. 448, p. 19–22, 1999.
- GONCALVES, G. M.; PAULA, G. C. de; CAVALCANTI, M. A.; HORTA, B. Métodos de multi-docking generalizado. 2014. Disponível em : < [http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio\\_resumo2013/relatorios\\_pdf/ctc/ELE/ELE-Guilherme%20Mayer%20Gon%C3%A7alves%20e%20Gabriel%20Coutinho%20de%20Paula.pdf](http://www.puc-rio.br/pibic/relatorio_resumo2013/relatorios_pdf/ctc/ELE/ELE-Guilherme%20Mayer%20Gon%C3%A7alves%20e%20Gabriel%20Coutinho%20de%20Paula.pdf)>.
- GORDON, M. S.; FEDOROV, D. G.; PRUITT, S. R.; SLIPCHENKO, L. V. Fragmentation Methods: A Route to Accurate Calculations on Large Systems. **Chemical Reviews** .112: 632-672, 2012.
- GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E.; Receptor–Ligand Molecular Docking. **Biophysical Reviews**, 6: p. 75–87, 2014.
- HARDY, W. R.; STRAUSS, J. H. Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. **J Virol. Nov**. v. 63, n. 11, p. 4653-64, 1989.
- HE, X.; ZANG, J. Z; A new method for direct calculation of total energy of protein. **The Journal of Chemical Physics**. v. 22: 31103, 2005.
- HELENIUS, A.; MARSH, M.; WHITE, J. Inhibition of Semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases. **J. Gen. Virol**. v. 58, p. 47– 61, 1982.
- HUMPHREYW; DALKEA; SCHULTENK. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, V.14, p. 33–38, 1996.
- HUNG-JINHUANG; WEIYU, H.; CHIEN-YUCHEN; CHIH-HOHSU; HSIN-YICHEN; KUEI-JENLEE; FUU-JENTSAL; YU-CHIANCHEN, C. Current developments of computer-aided drug design. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. v. 41, n. 6, p. 623-635, 2010.
- IRWIN, J. J.; BRIAN K. S. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. **Journal of chemical information and modelling**, 2005.
- JADAV, S.; JAYAPRAKASH, V.; BASU, A.; SINHA, B. 'Chikungunya Protease Domain–High Throughput Virtual Screening'. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Science Index 72, **International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering**. v. 6(12), p. 718 - 727, 2012.
- JADAV, S. S.; SINHA, B. N.; HILGENFELD, R.; JAYAPRAKASH, V. Computer-Aided Structure Based Drug Design Approaches for the Discovery of New Anti-CHIKV Agents. **Current Computer-Aided Drug Design**. v. 13, n. 4, p. 346 - 361, 2017.

- KALLIO, K.; HELLSTRÖM, K.; JOKITALO, E.; AHOLA, T. RNA Replication and Membrane Modification Require the Same Functions of Alphavirus Nonstructural Proteins. **J. Virol.** v. 90, p. 1687–1692, 2016.
- KARPE, Y. A.; AHER, P. P.; LOLE, K. S. NTPase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Chikungunya Virus nsP2 Protein. **PLoS One.** v. 6, p. 223-36, 2011.
- KAUR, P.; CHU, J. J. Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges. **Drug Discov Today.** v. 18, p. 969-83, 2013.
- KITCHEND, B.; DECORNEZ, H.; FURRJ, R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews-Drug Discovery,** v. 3, p.935–949, 2004.
- LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology,** v. 6, p. 402–406, 1996.
- LIONTA, E.; SPYROU, G.; VASSILATIS, D. K.; COURNIA, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. **Curr Top Med Chem.** v. 14, n. 16, p. 1923-38, 2014.
- LIPINSKI, C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews,** 1997.
- PRESTI, A. L.; LAI, A.; CELLA, E.; ZEHENDER, G.; CICCOCZI, M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. **Asian Pac J Trop Med.** v. 7, n. 12, p. 925-32, 2014.
- MACKERELL, A. D.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK, R. L.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA S., JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN D. T., PRODHOM B., REIHER W. E., ROUX B., SCHLENKRICH M., SMITH J. C., STOTE R., STRAUB J., WATANABE M., WIÓRKIEWICZ-KUCZERA J., YIN D. & KARPLUS M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **J Phys Chem B.** 1998.
- MAHESHWARI, R. K.; Srikantan, V.; Bhartiya, D. Chloroquine enhances replication of Semliki Forest virus and encephalomyocarditis virus in mice. **J. Virol.** v. 65, p. 992– 995, 1991.
- MARANHÃO, P. A. C.; TEIXEIRA, C. S.; SOUSA, B. L.; BARROSO-NETO, I. L.; MONTEIRO-JUNIOR, J. E.; FERNANDES, A. V., RAMOS, M. V., VASCONCELOS, I. M.; GONÇALVES, J. F. C., ROCHA, B. A .M., FREIRE, V. N.; GRANGEIRO, T. B. cDNA cloning, molecular modeling and docking calculations of L-type lectins from *Swartzia simplex* var. *grandiflora* (Leguminosae, Papilionoideae). **Phytochemistry,** V. 139, p.60–71, 2017.
- MERITS, A.; VASILJEVA, L.; AHOLA, T.; KAARIANEN, L.; AUVINEN, P. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. **J. Gen. Virol.** v. 82, p. 765–773, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico, vol. 48, n. 3, 2017.
- NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. da. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclét. Quím.** vol.33, n.4, pp.13-24, 2008.
- NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; DE VASCONCELOS, J. M.; GOLDING, N.; KRAEMER, M. U. G.; DE OLIVEIRA, L. F. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine.** v. 13, 2015.

- PANDA, D.; ROSE, P.P.; HANNA, S.L.; GOLD, B.; HOPKINS, K.C.; LYDE, R.B.; MARKS, M.S.; CHERRY, S. Genome-wide RNAi screen identifies SEC61A and VCP as conserved regulators of Sindbis virus entry. **Cell Rep.** v. 5, p. 1737–1748, 2013.
- PASTORINO, B. A.; PEYREFITTE, C. N.; ALMERAS, L.; GRANDADAM, M.; ROLLAND, D.; TOLOU, H. J.; BESSAUD, M. Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus. **Virus Res.** v. 131, p. 293–298, 2008.
- PHILLIPS, J.C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J.; TAJKHORSHID, E.; VILLA, E.; CHIPOT, C.; SKEEL, R.D.; KALÉ, L.; SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **J. Comput. Chem.** v. 26, p. 1781–1802, 2005.
- POLGÁR, L. Mercaptide—imidazolium ion-pair: The reactive nucleophile in papain catalysis. **FEBS Letters.** v. 47, n. 1, p. 15-18, 1974.
- RAHA, K.; PETERS, M. B.; WANG, B.; YU, N.; WOLLACOTT, A. M.; WESTERHOFF, L. M.; ANDMERZ, K. M. JR. The role of quantum mechanics in structure-based drug design. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 725–731, 2007.
- 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.
- RAUSALU, K.; UTT, A.; QUIRIN, T.; VARGHESE, F. S.; ŽUSINAITE, E.; DAS, P. K.; AHOLA, T.; MERITS, A. Chikungunya virus infectivity, RNA replication and non-structural polyprotein processing depend on the nsP2 protease's active site cysteine residue. **Nature: Scientific Reports.** 2016.
- ROSE, P.P.; HANNA, S.L.; SPIRIDIGLIOZZI, A.; WANNISSORN, N.; BEITING, D.P.; ROSS, S.R.; HARDY, R.W.; BAMBINA, S.A.; HEISE, M.T.; CHERRY, S. Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for sindbis virus in both insect and mammalian hosts. **Cell Host Microbe.** v. 10, p. 97–104, 2011.
- ROSS, R. W. The Newala epidemic III; the virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **J Hyg.** v. 54, p. 177-191, 1956.
- SALONEN, A. Properly Folded Nonstructural Polyprotein Directs the Semliki Forest Virus Replication Complex to the Endosomal Compartment. **J. Virol.** v. 77, p. 1691–1702, 2003.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat Rev Microbiol** v. 8: p. 491-500, 2010.
- SHEN, J.; ZHANG, W.; FANG, H.; PERKINS, R.; TONG, W.; HONG, H. Homology modeling, molecular docking, and molecular dynamics simulations elucidated  $\alpha$ -fetoprotein binding modes. **BMC Bioinformatics**, 14 (Suppl 14), S6, 2013.
- SHOICHET, BRIAN K. Virtual Screening of Chemical Libraries. **Nature.** p. 862–865, 2004
- SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Rev Med Virol.** v. 21, n. 2, p. 78-88, 2011.
- SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE, E. W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacol Rev.** v. 66, p. 334-95, 2013.
- STRAUSS, E. G.; DE GROOT, R. J.; LEVINSON, R.; STRAUSS, J. H. Identification of the active site residues in the nsP2 proteinase of Sindbis virus. **Virology.** v. 191, p. 932–940, 1992.
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev.** v. 58, n. 3, p. 491-562, 1994.

- THIBERVILLE, S-D.; MOYEN, N.; DUPUIS-MAGUIRAGA, L.; NOUGAIREDE, A.; GOULD, E. A.; ROQUES, P. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res.** v. 99, n. 3, p. 345-70, 2013.
- TORRES, J. R.; LEOPOLDO, C. G.; CASTRO, J. S.; RODRIGUEZ, L.; SARAVIA, V.; ARVELAEZ, J. Chikungunya fever: atypical and lethal cases in the Western hemisphere. A Venezuelan experience. **IDCases.** v. 2, n. 1, p. 6-10, 2014.
- TROTT, O.; OLSON A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput. Chem.** v. 31, p. 455–461, 2010.
- UTT, A.; DAS, P. K.; VARJAK, M1.; LULLA, V.; LULLA, A.; MERITS, A. Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. **J Virol.** v. 89, n. 6, p. 3145-62, 2014.
- VEBER D. F., JOHNSON S. R., CHENG H. Y., SMITH B. R., WARD K. W. & KOPPLE K. D., Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem.** v. 45, n. 12, p. 2615-23, 2002.
- VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Moleculares**, FAPERGS, 1ª edição, 2014.
- VICATOS, S.; ROCA, M.; WARSHEL, A. Effective approach for calculations of absolute stability of proteins using focused dielectric constants. **Proteins: Struct.Funct.Bioinf.** V. 77, p. 670–684, 2009.
- ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy. **Journal of Chemical Physics.** 119: 3599-3605, 2003.
- ZANATTA G.; BARROSO-NETO I.L.; VICTORIO BAMBINI-JUNIOR M.F.D.; DUTRA, M.F.; BEZERRA, E.M.; DA COSTA, R.F.; CAETANO, E.W.S.; CAVADA, B.S.; FREIRE, V.N.; GOTTFRIED, C. Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride. **J. Proteomics Bioinform.** V. 5, p. 155–162, 2012.
- ZHOU, T.; HUANG, D. Z.; CAFLISCH, A. A Quantum mechanical methods for drug design. **Curr. Top. Med. Chem.** V. 10, p. 332–345, 2010.