



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANA BEATRIZ FREIRE COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DA ZIKA E ANÁLISE  
COMPUTACIONAL DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL INIBITÓRIO**

**FORTALEZA**

**2017**

ANA BEATRIZ FREIRE COSTA

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DA ZIKA E ANÁLISE  
COMPUTACIONAL DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL INIBITÓRIO

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para conclusão do curso de Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Dr. João Hermínio Martins da Silva

Fortaleza  
2017

ANA BEATRIZ FREIRE COSTA

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DA ZIKA E ANÁLISE  
COMPUTACIONAL DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL INIBITÓRIO

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para conclusão do curso de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovada em: 29/06/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. João Hermínio Martins da Silva (Orientador)  
Fundação Oswaldo Cruz Ceará (Fiocruz/CE)

---

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

---

Me. Disraeli Cavalcante Araújo Vasconcelos  
Fundação Oswaldo Cruz Ceará (Fiocruz/CE)

A Deus.

Aos meus pais, Bonagre e Sandra (*in  
memoriam*), Familiares e Amigos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força e conforto em momentos de dificuldades e fé para viver cada um dos meus dias.

À Fundação Oswaldo Cruz/CE pelos recursos cedidos para desenvolver meu trabalho.

Ao meu orientador, Dr. João Hermínio, por ter aberto as portas da Fiocruz/CE para mim e pela oportunidade única de aprendizado, sempre com muita paciência, compreensão e sabedoria.

Ao professor Dr. Hélio Costa, por seus ensinamentos ao longo do curso e por ter me dado a enorme satisfação em aceitar o convite para fazer parte da minha banca.

Ao Me. Disraeli Vasconcelos, por ter aceitado prontamente o convite para participar da minha banca e por estar sempre disposto a ajudar e à Me. Mayara Santiago que me proporcionou o primeiro contato com a biotecnologia, a quem eu admiro e agradeço pela disposição em participar como suplente.

À coordenação do curso de Biotecnologia, que dedica tempo e recurso aos alunos.

À minha família, que é meu suporte e bem mais precioso.

À minha mãe, minha maior saudade e o meu maior amor, que me ensinou a andar sempre pelo caminho certo, mesmo que mais longo e mais difícil. Que cuidou de mim, me deu suporte, carinho e que me inspira todos os dias a ser uma pessoa melhor, como ela foi.

Ao meu pai, que está ao meu lado em todos os momentos, desde o primeiro dia de aula do maternal até o primeiro dia de aula da faculdade, sempre me dando suporte, forças quando até ele mesmo não tinha e por ser o meu maior exemplo de fé e amor.

À minha avó, Lourdes, por ser minha segunda mãe, minha companheira e meu suporte diário, não poupando forças nem recursos para me ajudar a alcançar meus sonhos, a quem eu sou e sempre serei eternamente grata e aos meus avós maternos, Fernando e Violante, pelo amor e suporte depositados em mim.

Ao meu namorado, Neto Teixeira, por estar comigo em todos os momentos, desde os mais alegres até os mais difíceis, sempre acreditando em mim, por cada palavra de força e por seu carinho, amor e cumplicidade.

Aos amigos que a biotecnologia me deu, que sempre me inspiram a chegar mais alto e aos meus amigos do ensino médio, de intercâmbio e aos amigos que a vida me deu que são como uma segunda família.

“A única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível. ”

Lewis Carroll.

## RESUMO

O vírus da Zika, pertencente à família *Flaviviridae*, tem ganhado destaque no cenário mundial por sua associação com casos de microcefalia em recém-nascidos nos últimos anos, tornando-se prioridade global para a saúde pública. Dentre os países da América Latina, o Brasil foi um dos mais afetados pelos surtos causados pelo vírus da Zika. A sua rápida propagação, associada com os drásticos efeitos neurológicos causados pelo vírus nas células humanas, e a inexistência de tratamentos efetivos, fez com que surgisse a necessidade de desenvolver antivirais eficazes e seguros em um curto período de tempo. Assim, a bioinformática passa a ser utilizada como ferramenta para solucionar esse problema com maior rapidez e eficácia. O foco do presente trabalho se deteve na busca de moléculas com potencial farmacológico, por meio da metodologia de *docking* molecular, para a inibição da replicação do vírus da Zika, tendo como alvo as proteínas não-estruturais NS1 e NS3 do vírus. Inicialmente, os sítios de ligação das proteínas virais foram identificados por meio dos programas *metaPocket* e *FTMap* e as melhores cavidades foram escolhidas como alvo para o *docking*. O *docking* molecular foi realizado com o programa *AutoDock Vina* e as interações resultantes entre o sítio de ligações das proteínas virais com as moléculas dos ligantes Niclosamida e PHA-690509 foram analisadas. Com o objetivo de avaliar o potencial dessas moléculas como possíveis inibidores competitivos, os complexos proteína-ligante de menor energia resultantes do *docking* foram analisados e comparados. A molécula de Niclosamida, devido às ligações estáveis estabelecidas com o sítio de ligação das proteínas alvo e por seu uso considerado seguro durante a gravidez de acordo com a OMS, foi considerada um potencial inibidor a ser futuramente explorado no tratamento da Zika.

**Palavras-chave:** Vírus da Zika. Proteínas não-estruturais. *Docking* molecular.

## ABSTRACT

The Zika virus belongs to the family *Flaviviridae* and in the recent years, its association with cases of microcephaly in newborns has been highlighting in the world becoming a global priority for public health. Brazil is one of the Latin American countries most affected by outbreaks caused by the Zika virus. The brisk spread and the drastic neuro-developmental problems caused by the virus in human cells, and the lack of effective treatments have led to the need to develop effective and safe antivirals in a short time period. Therefore, bioinformatics can be used as a tool to solve these problems quickly and effectively. The goal of this work was to obtain molecules with pharmacological potential to inhibit the replication of the Zika virus through the use of the non-structural proteins NS1 and NS3 of Zika Virus as a target. First, the viral proteins binding sites were identified through the *metaPocket* and *FTMap* programs and the best pockets were chosen as targets for the docking. The molecular docking was performed with *AutoDock Vina* and the interactions between the proteins binding sites with the ligands Niclosamide and PHA-690509 were investigated. In order to evaluate the potential of these molecules as possible competitive inhibitors, the protein-ligand complexes with lower energy, which resulted from the dockings, were analyzed and compared. Niclosamide was considered a potential inhibitor to be further explored in the treatment of Zika because of its safe use during pregnancy according to WHO and in view of the fact that the stable linkages established with the binding site of targets proteins.

**Keywords:** Zika virus. Non-structural proteins. Molecular Docking.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição do vírus da ZIKA pelos países. ....	18
Figura 2 – Representação do genoma do ZIKV. ....	25
Figura 3 – Superfície ladder ( $\beta$ -ladder) e superfície loop (loop surface) da proteína NS1 do vírus da Zika. ....	27
Figura 4 – Estrutura do domínio de helicase da proteína NS3 do ZIKV. ....	29
Figura 5 – Moléculas de (a) Niclosamida e (b) PHA-690509 obtidas pelo <i>PubChem Compound</i> . ....	38
Figura 6 – Cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV ligado as moléculas de NAG, assinalados pelas setas. ....	41
Figura 7 – Cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV em complexo com a molécula de ssRNA, indicada pela estrutura de cor cinza, na região central da molécula. ....	42
Figura 8 – Cristal 5GJC da proteína NS3 do ZIKV em complexo com uma molécula de ATP (indicada pela estrutura em forma de bastão) e ao íon manganês (indicado pela esfera de cor azul). ....	43
Figura 9 – Cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV, mostrando as cavidades encontradas pelo Metapocket, em diferentes cores indicadas pelas setas. ....	44
Figura 10 – Superfície do cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV com suas respectivas cavidades indicadas pelas setas. ....	45
Figura 11 – Cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV e suas respectivas cavidades identificadas pelo FTMap. ....	46
Figura 12 – Cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV e suas cavidades, MPT1, MPT2 e MPT3, indicadas pelas cores laranja, vermelho e magenta, respectivamente. ....	47
Figura 13 – Superfície do cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV com as cavidades MPT1 e MPT3 indicadas pelas cores laranja e magenta, respectivamente. ....	47
Figura 14 – Cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV e suas respectivas cavidades identificadas pelo FTMap indicadas pela seta. ....	48
Figura 15 – Cristal 5GJC da proteína NS3 do ZIKV e suas cavidades: MPT1, MPT2 e MPT3, indicadas pelas cores laranja, vermelho e magenta, respectivamente. ....	49

Figura 16 – Estrutura da superfície do cristal com as cavidades MPT1, MPT2 e MPT3 indicadas pelas cores laranja, vermelha e magenta, respectivamente. ....	50
Figura 17 – Perfil eletrostático do cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV.....	51
Figura 18 – Perfil eletrostático do cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV com a cavidade MPT2 inserida. ....	51
Figura 19 – Perfil eletrostático do cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV, com a cavidade MPT1 inserida. ....	52
Figura 20 – Perfil eletrostático do cristal 5GJC da proteína NS3 do ZIKV, com a cavidade MPT3 inserida.. ....	53
Figura 21 – Distribuição de microestados para a Niclosamida em função do pH e as estruturas observadas à esquerda.....	54
Figura 22 – Distribuição de microestados para o PHA-690509 em função do pH e as estruturas observadas à esquerda. ....	55
Figura 23 – Interação 3D do ligante Niclosamida com o cristal 5GS6 da proteína NS1 predito pelo <i>docking</i> molecular.....	58
Figura 24 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de Niclosamida e a cavidade do cristal 5GS6 da proteína NS1. ....	59
Figura 25 – Interação 3D do ligante PHA-690509 com o cristal 5GS6 da proteína NS1 predito pelo <i>docking</i> molecular.....	60
Figura 26 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de PHA-690509 e a cavidade do cristal 5GS6 da proteína NS1.....	61
Figura 27 – Interação 3D do ligante Niclosamida com o cristal 5GJB da proteína NS3 predito pelo <i>docking</i> molecular.....	62
Figura 28 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de Niclosamida e a cavidade do cristal 5GJB da proteína NS3. ....	63
Figura 29 – Interação 3D do ligante PHA-690509 com o cristal 5GJB da proteína NS3 predito pelo <i>docking</i> molecular.....	64
Figura 30 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de PHA-690509 e a cavidade do cristal 5GJB da proteína NS3.....	65
Figura 31 – Interação 3D do ligante Niclosamida com o cristal 5GJC da proteína NS3 predito pelo <i>docking</i> molecular.....	67

Figura 32 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de Niclosamida e a cavidade do cristal 5GJC da proteína NS3. ....	68
Figura 33 – Interação 3D do ligante PHA-690509 com o cristal 5GJC da proteína NS3 predito pelo <i>docking</i> molecular.....	69
Figura 34 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de PHA-690509 e a cavidade do cristal 5GJC da proteína NS3.....	70

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – <i>Docking</i> Molecular do Cristal 5GS6 da proteína NS1 com os ligantes Niclosamida e PHA-690509. ....	56
Gráfico 2 – <i>Docking</i> Molecular do Cristal 5GJB da proteína NS3 com os ligantes Niclosamida e PHA-690509. ....	56
Gráfico 3 – <i>Docking</i> Molecular do Cristal 5GJC da proteína NS3 com os ligantes Niclosamida e PHA-690509. ....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5GJB	Cristal da Proteína NS3 do vírus da Zika associado com ssRNA
5GJC	Cristal da Proteína NS3 do vírus da Zika associado com ATP
5GS6	Cristal da Proteína NS1 do vírus da Zika
Ala	Alanina
APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
CHIKV	Chikungunya vírus
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CDKi	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina
DENV	Virus da dengue
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBS	Síndrome de <i>Guillain-Barré</i>
Gly	Glicina
hNPCs	Células Humanas Progenitoras Neurais
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
LOPAC	<i>Library of Pharmacologically Active Compounds</i>
Met	Metionina
MPT1	Cavidade 1
MPT2	Cavidade 2
MPT3	Cavidade 3
NAG	N-acetil-D-glicosamina
NCATS	<i>National Center for Advancing Translational Sciences</i>
NS1	Proteína Não Estrutural 1
NS3	Proteína Não Estrutural 3
NTPs	Nucleotídeos Trifosfatados

NTPase	Nucleosídeo Trifosfatase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Read Frame</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Phe	Fenilalanina
ssRNA	Fita simples de RNA de sentido único
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
VINA	<i>AutoDock Vina</i>
Val	Valina
VT	<i>Virtual Screening</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	<i>Vírus da Zika: histórico e visão geral</i> .....	17
1.2	<i>Transmissão e mecanismo de reposta do ZIKV no organismo hospedeiro</i> .....	19
1.3	<i>Sintomas</i> .....	21
1.4	<i>Tratamentos vigentes e métodos preventivos</i> .....	21
1.5	<i>Agravantes do ZIKV: microcefalia e síndrome de Guillain-Barré</i> .....	22
1.6	<i>Caracterização e virologia</i> .....	24
1.7	<i>Proteína NS1: caracterização e importância como alvo molecular</i> .....	26
1.8	<i>NS3 helicase: um importante alvo molecular</i> .....	28
1.9	<i>Readequação de Fármacos</i> .....	30
1.10	<i>Moléculas com potencial farmacológico contra o ZIKV</i> .....	31
1.11	<i>Ferramentas computacionais</i> .....	32
1.12	<i>Justificativas</i> .....	33
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	<i>Objetivo Geral</i> .....	34
2.2	<i>Objetivos Específicos</i> .....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1	<i>Determinação dos alvos moleculares</i> .....	35
3.2	<i>Seleção dos cristais das proteínas não-estruturais NS1 e NS3</i> .....	35
3.3	<i>Definição dos sítios de ligação dos cristais das proteínas NS1 e NS3</i> .....	36
3.4	<i>Perfil eletrostático das cavidades das proteínas NS1 e NS3</i> .....	37
3.5	<i>Seleção e preparo dos ligantes para o docking molecular</i> .....	38
3.6	<i>Docking molecular</i> .....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1	<i>Análise dos cristais das proteínas não-estruturais NS1 e NS3 do ZIKV</i> .....	41
4.2	<i>Determinação dos sítios de ligação dos cristais das proteínas NS1 e NS3 do ZIKV</i> . 43	
4.2.1	<i>Cavidades encontradas para o cristal 5GS6 da proteína NS1</i> .....	43
4.2.2	<i>Cavidades encontradas para o cristal 5GJB da proteína NS3</i> .....	46
4.2.3	<i>Cavidades encontradas para o cristal 5GJC da proteína NS3</i> .....	49
4.3	<i>Análise do perfil eletrostático dos cristais das proteínas NS1 e NS3</i> .....	50
4.4	<i>Estado de protonação dos ligantes</i> .....	54
4.5	<i>Análise do docking molecular usando o VINA</i> .....	55
4.5.1	<i>Análise dos complexos proteína-ligante de menor energia usando o Maestro</i> .....	57

4.5.1.1 <i>Análise dos complexos do Cristal 5GS6 da proteína NS1 resultantes do docking</i> .....	58
4.5.1.2 <i>Análise dos complexos do Cristal 5GJB da proteína NS3 resultantes do docking</i> .....	62
4.5.1.3 <i>Análise dos complexos do Cristal 5GJC da proteína NS3 resultantes do docking</i> .....	66
4.6 Considerações finais e perspectivas .....	71
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Vírus da Zika: histórico e visão geral

O processo de globalização levou ao aumento em larga-escala da circulação de pessoas e animais entre os continentes, causando a propagação de vetores antes geograficamente isolados. Junto a esses fatores, mudanças climáticas e o aquecimento global impulsionaram o reaparecimento de diversas viroses causadas por alguns arbovírus, como vírus da dengue (DENV), *West Nile* (WNV), Chikungunya (CHIKV) e vírus da ZIKA (ZIKV), em decorrência da redefinição geográfica de seus devidos vetores (CHAN *et al.*, 2016).

Pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, o vírus da Zika é classificado como arbovírus, ou seja, essencialmente transmitido por artrópodes, além de ser caracterizado como vírus de RNA de fita simples e sentido positivo (MUMTAZ *et al.*, 2016).

Mesmo com a rápida e divergente evolução dos *Flavivirus*, análises filogenéticas das sequências do genoma desses vírus confirmaram a proximidade do ZIKV com o DENV, WNV, vírus da febre amarela (do inglês *Yellow Fever* – YF) e, mais estreitamente com o vírus *Spondweni*. No entanto, diferente de outros membros do gênero *Flavivirus*, o ZIKV apresenta características únicas, sendo uma destas, o seu alto nível de recombinação homóloga. Esta característica permitiu uma melhor adaptação do vírus em seus vetores e, conseqüentemente, o avanço de sua disseminação por diferentes territórios (WANG *et al.*, 2017).

O vírus da Zika foi isolado pela primeira vez em 1947, no sangue de um macaco Rhesus (*Macaca mulata*) usado como sentinela para estudos com o vírus da Febre Amarela, no continente Africano, em uma floresta de nome Zika Forest na Uganda, recebendo assim o nome da mesma (DICK, KITCHEN e HADDOW, 1952). No ano seguinte, o ZIKV foi também isolado na mesma floresta em um mosquito do gênero *Aedes africanos*, sugerindo assim, que este tratava-se de um arbovírus. Em 1954, o vírus da Zika foi pela primeira vez identificado como um possível patógeno humano. O caso ocorreu em uma criança nigeriana de dez anos que apresentava sintomas de febre e dores de cabeça, na qual teve o vírus identificado em uma amostra de seu sangue (CHAN *et al.*, 2016).

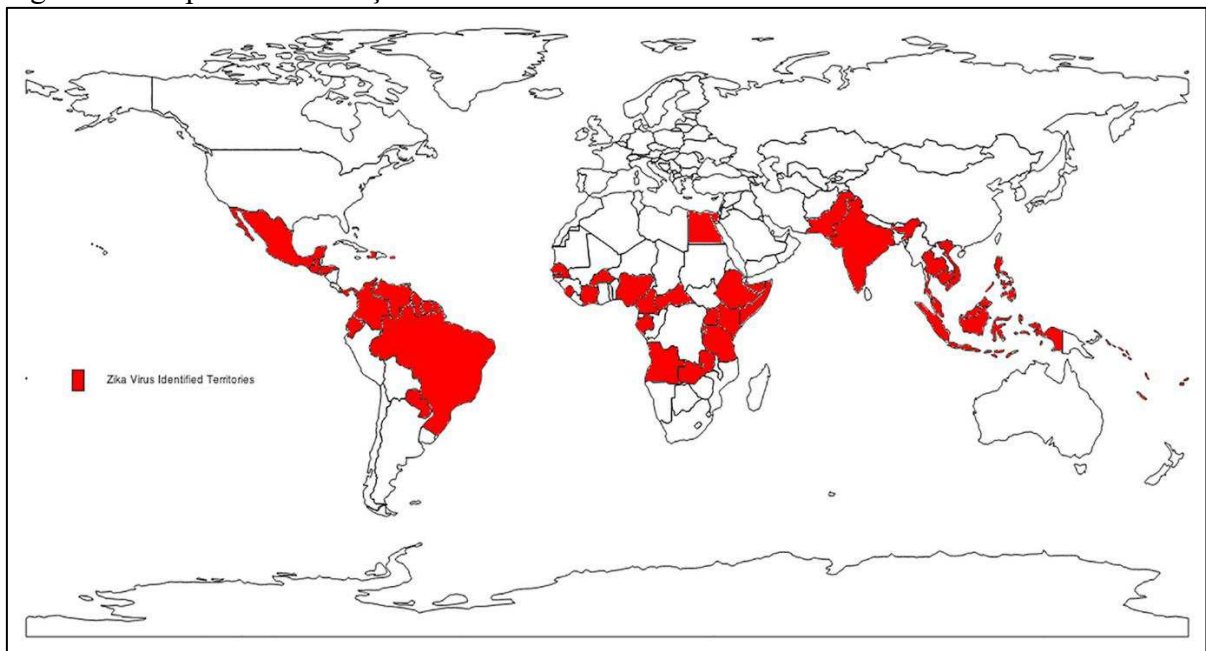
Após a descoberta do ZIKV, os primeiros casos de infecção em humanos permaneceram restritos ao continente Africano e Asiático por seis décadas. Apenas em 2007, evidências de casos associados ao vírus emergiram fora da África e Ásia, causando um surto nas Ilhas Yap, na Micronésia (DUFFY *et al.*, 2009). Outro grande surto foi reportado em 2013, na Polinésia Francesa, com 30.000 casos de infecção por ZIKV. Um ano depois, em 2014, casos

da doença foram identificadas no hemisfério ocidental, atingindo a população do Chile, espalhando-se para outros países da América Latina nos dois anos seguintes (CHAN *et al.*, 2016).

Dentre os países da América Latina, o Brasil foi um dos mais afetados pelo ZIKV, com uma estimativa de 440.000 – 1.300.000 casos no ano de 2015, de acordo com o Ministério da Saúde. Algumas hipóteses sugerem que a introdução do vírus em território brasileiro ocorreu devido a dois grandes eventos esportivos, sendo o maior deles a Copa do Mundo de 2014, que promoveu grande fluxo de turistas, principalmente da Ásia e, de diferentes partes do mundo para o Brasil (MALONE *et al.*, 2016). Além disso, as mudanças climáticas promovidas pelo fenômeno *El Niño* na América do Sul no ano seguinte, criaram condições climáticas permissivas e favoráveis para a propagação do mosquito *Aedes* e, conseqüentemente, do ZIKV (PAZ e SEMENZA, 2016).

Em contraste com a propagação relativamente lenta do vírus Ebola pelo continente Africano, o surto da Zika parece estar se espalhando em um ritmo muito avançado pelas Américas (Figura 1) (MALONE *et al.*, 2016). Desde a sua introdução no território brasileiro até o início de 2016, já foram relatados casos de Zika em 14 estados (CHAN *et al.*, 2016). No entanto, a associação de casos de Zika com neuropatias, bem como o nascimento de crianças com defeitos no sistema nervoso central e o aparente aumento de incidentes da Síndrome de *Guillain-Barré* (GBS) tornaram a Zika uma prioridade global para a saúde pública (CHAN *et al.*, 2016; MALONE *et al.*, 2016).

Figura 1 – Mapa de distribuição do vírus da ZIKA.



Fonte: MALONE *et al.*, 2016.

## 1.2 Transmissão e mecanismo de reposta do ZIKV no organismo hospedeiro

A transmissão do vírus da ZIKA, assim como a de outros *Flavivírus* (DENV e CHIKV), ocorre principalmente pela picada de mosquitos fêmeas, preferencialmente durante o dia (MALONE *et al.*, 2016). Diversas espécies de mosquitos podem servir como vetores para o vírus, sendo o gênero *Aedes* (*Stegomyia*) um dos mais importantes. Alguns mosquitos, devido a sua maior distribuição geográfica, como o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, são considerados mais relevantes para o ciclo da transmissão urbana do ZIKV. Além desses, outros gêneros, bem como *Anopheles*, *Culex*, *Eretmapodites* e *Mansonia* são considerados possíveis vetores para a transmissão do ZIKV (MOGHADAM *et al.*, 2016).

A transmissão horizontal ocorre quando ao picar um paciente infectado, o mosquito do gênero *Aedes* ingere uma quantidade de sangue, contendo o vírus da Zika que se replica nas células epiteliais do intestino médio do mosquito e posteriormente, nas células da glândula salivar. Após um período de incubação de 5-10 dias, o ZIKV pode ser encontrado na saliva do vetor, podendo assim, iniciar um novo ciclo e infectar outras pessoas (LI *et al.*, 2012). A transmissão vertical também pode ocorrer pela difusão do ZIKV para outros membros do gênero *Flavivírus* (CHAN *et al.*, 2016).

Após a picada do mosquito contaminado, a saliva contendo o ZIKV é inoculada na pele humana, contornando a primeira linha de defesa do corpo e atingindo fibroblastos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas (MALONE *et al.*, 2016). A ligação do vírus na célula hospedeira é mediada pelas células do envelope viral (E), que junto ao processo de endocitose mediada por receptores, permite a penetração do vírus na célula (WANG *et al.*, 2017). Os fibroblastos e queratinócitos apresentam como receptores: Tyro3, TIM-1 e AXL, sendo este último, o receptor primário para entrada do vírus (CHAN *et al.*, 2016). Após a entrada do vírus na célula e sua consequente replicação, vias de sinalização são ativadas com subsequente ativação de fatores de transcrição que causam desregulação da transcrição da célula hospedeira, conduzindo a respostas antivirais e ao aparecimento de sintomas da doença (WANG *et al.*, 2017).

A resposta inflamatória do organismo do hospedeiro é também ativada pelo vírus da Zika, que atrai as células T e outros leucócitos para o local da infecção, acompanhado do aumento da produção de moléculas de quimiocina e citocina que ao se acumularem, junto a fatores imunes, causam danos aos tecidos. Além disso, o vírus da Zika ativa respostas associadas à apoptose e à regulação de células neuronais (células da glia), que induzem à morte

das células e desregulação da progressão do ciclo celular, bem como das células da glia (WANG *et al.*, 2017).

A associação do ZIKV com células neuronais e sua consequente desregulação, junto ao processo de morte celular, aumentam as evidências da possível associação do ZIKV com a microcefalia. Mais ainda, hipóteses supõem a associação do ZIKV com doenças autoimunes, como a síndrome de *Guillain-Barré*, devido à forte resposta inflamatória, causada pelo vírus na célula hospedeira (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016).

Ao contrário de muitos membros do gênero *Flavivirus*, o vírus da Zika pode ser transmitido também de uma pessoa infectada para outra por diferentes rotas, bem como por transfusão de sangue, contato sexual e transmissão perinatal, ou seja, da mãe para o feto (MOGHADAM *et al.*, 2016).

A transmissão via transfusão de sangue é comum a outros arbovírus, especialmente em regiões endêmicas. No entanto, diferentemente dos demais arbovírus, o ZIKV apresenta altas probabilidade e particularidade no que se refere à transmissão sexual (CHAN *et al.*, 2016). De acordo com Nicastrì *et al.* (2016), o RNA do ZIKV pode persistir no sêmen por mais de seis meses, indicando o prolongado risco de transmissão por meio de atividade sexual.

Atualmente, a transmissão do vírus da Zika para o feto apresenta-se como maior preocupação para os órgãos mundiais de saúde, devido à associação do ZIKV com severas anomalias congênitas, podendo ocorrer por meio da atividade sexual, onde o vírus é transmitido para o parceiro feminino e deste para o feto, por meio da transmissão perinatal ou transplacentária (MOGHADAM *et al.*, 2016).

Muitos estudos demonstram a presença do ZIKV no cérebro de fetos e recém-nascidos que apresentam sinal de microcefalia e no líquido amniótico de mulheres infectadas com o vírus. (MALONE *et al.*, 2016). Além disso, partículas do RNA viral do Zika foram encontradas no leite e na saliva de mulheres grávidas infectadas, possibilitando a transmissão do vírus para a criança, após o nascimento por meio da troca de fluidos corporais (MOGHADAM *et al.*, 2016).

Outra possível forma de transmissão ocorre pela exposição mucocutânea do vírus em sangue infectado ou por hemodiálise, transplante e mordida de macaco (CHAN *et al.*, 2016). Partículas do RNA viral do Zika foram encontradas na urina e saliva de pacientes infectados, com permanência de 30 dias. No entanto, ainda não há confirmação de que esses fluidos possam facilitar a transmissão do vírus (WANG *et al.*, 2017).

### 1.3 Sintomas

Dentre os pacientes diagnosticados com Zika, 20% apresentam sintomas leves e 80% são assintomáticos, no período inicial da infecção (MALONE *et al.*, 2016). Os sintomas geralmente se expandem depois do período de incubação do vírus, que pode durar de 2 a 14 dias. Além disso, indivíduos com o sistema imune comprometido estão mais susceptíveis a desenvolver sintomas mais graves, quando infectados pelo ZIKV (MOGHADAM *et al.*, 2016).

A maioria dos sintomas típicos da Zika são similares aos das infecções causadas pelo DENV e CHIKV, sendo eles: febre, dor nos olhos, conjuntivite, dores musculares, manchas vermelhas na pele, letargia e artralgia. Em adição, alguns sintomas relacionados ao sistema digestivo também podem ser diagnosticados em pacientes infectados com Zika, como náusea, vômito, diarreia, constipação e dores abdominais (SHAN *et al.*, 2016).

Entretanto, algumas características sutis nos sintomas diferenciam a Zika da Dengue e da febre Chikungunya, incluindo dores de cabeça menos severas, edemas mais eminentes nas extremidades e no geral, sintomas mais amenizados. Além disso, as dores nas articulações causadas pelo ZIKV são menos intensas quando comparadas às existentes na febre Chikungunya e as complicações hemorrágicas reportadas em pacientes com dengue não foram detectadas em casos de Zika (MOGHADAM *et al.*, 2016).

Nos casos mais severos, relatou-se a associação da infecção causada pelo ZIKV com a síndrome *Guillain-Barré* e casos de microcefalia, relatados principalmente no Brasil e na Colômbia no período de 2014 a 2015 (SHAN *et al.*, 2016).

### 1.4 Tratamentos vigentes e métodos preventivos

Atualmente, ainda não existem vacinas nem tratamentos disponíveis para conter o vírus da Zika, sendo a prevenção, a melhor forma de evitar a transmissão do vírus. Contudo, nos casos sintomáticos da doença, medicamentos contendo paracetamol podem ser usados para aliviar as febres e dores musculares (CHAN *et al.*, 2016).

A hidratação é extremamente necessária, devido à perda excessiva de fluidos por transpiração e vômito. Além disso, alguns medicamentos como aspirina devem ser evitados, devido aos riscos de sangramento em pessoas com trombocitopenia, bem como anti-inflamatórios não-esteroides, a fim de evitar complicações hemorrágicas em casos de diagnóstico futuros de Dengue ou Chikungunya. No caso de complicações neurológicas,

especialmente GBS, o diagnóstico deverá ser o mais rápido possível, para que tratamentos com imunoglobulinas intravenosas ou o uso de plasmáferese sejam realizados (CHAN *et al.*, 2016).

Testes sorológicos e ultrassom-fetal devem ser oferecidos para mulheres grávidas que apresentam sintomas da doença ou que viajaram para áreas de risco dentro dos dois primeiros meses da gestação, além do monitoramento do desenvolvimento fetal nos casos suspeitos de infecção congênita pelo ZIKV (PETERSEN *et al.*, 2016).

Em relação às ações preventivas, tanto as medidas pessoais, quanto as de controle do vetor devem ser tomadas para interromper a transmissão do ZIKV. Autoridades da área da saúde devem promover programas de vigilância, investindo em campanhas de saneamento para a eliminação do mosquito e de criadouros em áreas de risco. Além disso, a conscientização da população é extremamente necessária para evitar a formação de locais propícios para a criação do mosquito (CHAN *et al.*, 2016).

Viagens para estados ou países que apresentaram surto de Zika devem ser evitadas. Para os residentes de áreas endêmicas, o uso de repelente deve ser feito, principalmente em crianças, mulheres grávidas e lactantes. Em casos de transfusão de sangue e/ou transplante de órgãos, caso o doador tenha visitado áreas de risco, é essencial a realização de testes, após no mínimo 14 dias de sua volta para confirmar se não houve contaminação do mesmo com o ZIKV (MOGHADAM *et al.*, 2016).

Devido a permanência do ZIKV no sêmen e conseqüentemente, o alto risco de transmissão sexual (NICASTRI *et al.*, 2016), homens que viajaram para regiões de risco devem manter o uso imprescindível de preservativos em suas relações sexuais, principalmente em caso de suas parceiras estarem grávidas (RAWAL, YADAV e KUMAR, 2016). Por último, a Organização Mundial da Saúde recomenda que mulheres em período de gestação devem tomar medidas de proteção individual para evitar qualquer forma de contaminação, seja sexual ou via picada do mosquito (MOGHADAM *et al.*, 2016).

### **1.5 Agravantes do ZIKV: microcefalia e síndrome de *Guillain-Barré***

A microcefalia é uma desordem congênita multifatorial que atinge o desenvolvimento neurológico, causando a diminuição na circunferência da cabeça de crianças recém-nascidas. Ela é causada por fatores genéticos, infecções intrauterinas, desnutrição grave na gestação, atingindo 1.3 de 150/100.000 recém-nascidos. Os sintomas incluem perda de audição, retardo mental, atraso nas funções motoras e da fala, convulsão e paralisia cerebral, não existindo tratamento específico para a mesma (MALONE *et al.*, 2016; SHAN *et al.*, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu em 2015, no território brasileiro, uma associação temporal entre o surto do ZIKV e o aumento do número de casos de microcefalia. Evidências desta associação ganharam maior proporção, quando o ZIKV foi encontrado no líquido amniótico de dois fetos que apresentavam microcefalia (SOUZA *et al.*, 2016). Pesquisadores da Fiocruz-Paraná reportaram que o vírus pode atravessar a placenta durante a gravidez, o que sugere a transmissão intrauterina (MALONE *et al.*, 2016). Além disso, o vírus da Zika foi detectado junto a diversas alterações no cérebro de um feto abortado, não sendo detectado em nenhum outro tecido fetal (SOUZA *et al.*, 2016).

Em 2015, foram relatados um total de 3.500 casos de microcefalia associados ao ZIKV no Brasil. Pernambuco foi o primeiro estado brasileiro a reportar o aumento de casos de microcefalia, com 1.236 ocorrências, seguido por Paraíba, Bahia, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe, Alagoas, Mato Grosso e Rio de Janeiro. O número de mulheres portadoras do ZIKV durante a gravidez de crianças detectadas com microcefalia aumentou de 18% para 53%, o que confirmou que mulheres infectadas com o vírus tinham de 3.700 a 11.000 vezes mais chances de parto de crianças com microcefalia do que mulheres não infectadas com o vírus (MALONE *et al.*, 2016).

A partir de observações clínicas, realizadas no cérebro de fetos obtidos de mulheres infectadas, foi reportado que o ZIKV tem como alvo, células humanas progenitoras neurais (do inglês, *human neural progenitor cells* – hNPCs) e a consequente redução do seu crescimento, bem como, a diminuição da espessura dessas células que impulsionam o desenvolvimento do córtex no cérebro humano (XU *et al.*, 2016a).

Souza *et al.* (2016), a partir de seus experimentos, utilizando-se de uma cepa brasileira do ZIKV, demonstraram o alto grau de letalidade do vírus para células humanas progenitoras e células tronco neurais. Estas células expressam um fator de transcrição crítico para a indução da iniciação neural e para a manutenção da diferenciação de células tronco neurais progenitoras, chamado Sox2. Assim, o estudo sugeriu que essas células eram altamente susceptíveis ao ZIKV, que causava uma redução em sua população, por meio da indução da morte celular por apoptose (SOUZA *et al.*, 2016).

A indução por autofagia também foi observada em culturas com NPCs após introdução do ZIKV, processo descrito anteriormente em outros vírus de RNA como mecanismo facilitador da replicação viral. Em adição, um grande número de defeitos mitóticos foi detectado em células infectadas pelo ZIKV, o que induzia o processo de apoptose programada em uma parte das células e o aumento na frequência de aneuploidia em outra parte. As disfunções mitóticas explicavam assim, o fato do ZIKV causar uma redução na proliferação

das NPCs e o aumento do processo de apoptose, além de interferir no desenvolvimento do cérebro, o que poderia estar relacionado também com a redução do tamanho do mesmo em pacientes infectados com o vírus, resultando em microcefalia e outras anormalidades neurológicas associadas ao ZIKV (SOUZA *et al.*, 2016).

Além do aumento dos relatos de microcefalia, o surgimento abrupto de casos da síndrome de *Guillain-Barré*, com nível de mortalidade significativa, foi reportado atualmente no Brasil e em outros países da América Latina que declararam surto de Zika. A GBS é uma doença autoimune, na qual o próprio sistema imunológico do paciente cria um intenso processo inflamatório que destrói a bainha de mielina, bloqueando a passagem dos estímulos nervosos, o que causa fraqueza muscular e por vezes, paralisia flácida aguda (SHAN *et al.*, 2016).

A mortalidade associada aos casos de GBS é relativamente alta, sendo esta 70% associada com doenças infecciosas, tipicamente gastrointestinais e respiratórias. Em 2015, infecções causadas por ZIKV e, em menor escala, por CHIKV foram associadas com a GBS, sendo reportado previamente durante o surto de Zika na Polinésia Francesa, no período de 2014 a 2015, no qual 42 casos de GBS foram dados como positivo, tanto para o DENV quanto para ZIKV (MALONE *et al.*, 2016).

Portanto, a confirmação do aumento do número de casos de microcefalia e de GBS relacionados com o ZIKV se torna cada vez mais evidente e a busca por medidas defensivas, bem como vacinas, terapias e antivirais, é prioridade para os órgãos de saúde no mundo inteiro (EKINS *et al.*, 2016a).

No entanto, ainda existem muitos empecilhos para o desenvolvimento de um tratamento rápido e efetivo contra o ZIKV. A princípio, os grupos de riscos nos quais mulheres grávidas estão incluídas limitam opções potenciais para o tratamento do vírus, principalmente devido à sua toxicidade, tanto para a mãe quanto para o feto. Porém, torna-se necessário a busca de tratamentos para mulheres grávidas infectadas com ZIKV, para reduzir o risco de transmissão do vírus para o feto, e de tratamentos efetivos que impeça a transmissão do vírus para toda a população (EKINS *et al.*, 2016a).

## 1.6 Caracterização e virologia

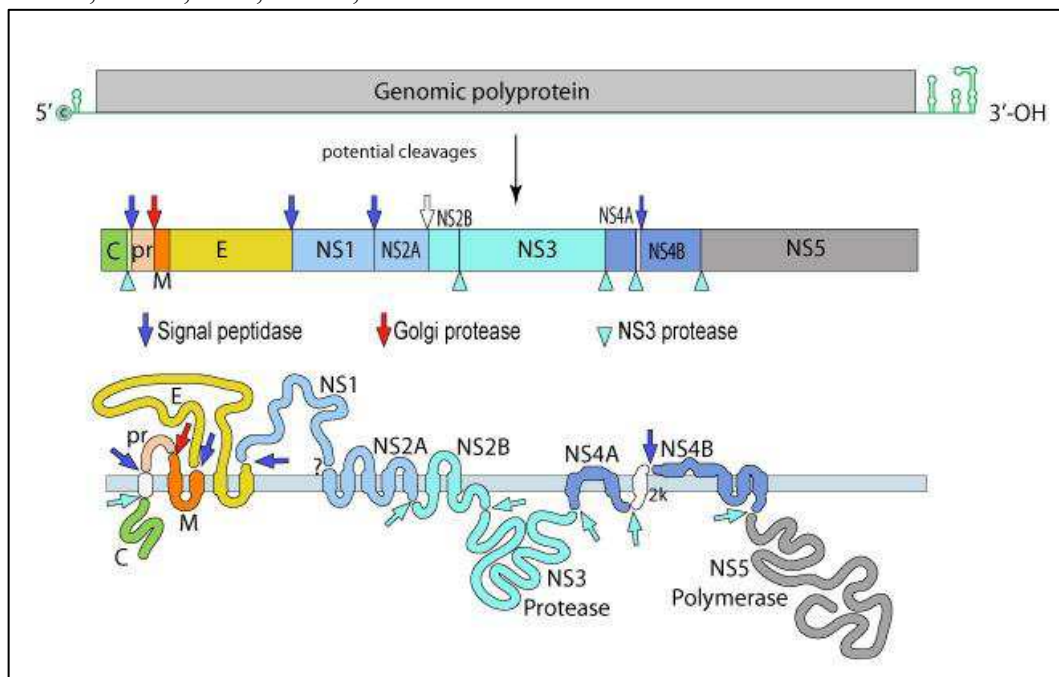
O vírus da Zika, assim como o WNV, DENV e vírus da febre amarela são filogeneticamente classificados como pertencentes ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviridae* (BOLLATI *et al.*, 2010 *apud* ARMSTRONG, HOU e TANG, 2017). Derivado do latim *flavus*, que significa amarelo, a família *Flaviridae* recebeu este nome devido ao vírus da febre amarela,

um importante membro desta família que representa um referencial para a história da virologia (BOLLATI *et al.*, 2010).

Como característica comum aos membros dessa família, os *Flavivírus* apresentam-se envelopados por um capsídeo em forma de icosaedro (ARMSTRONG, HOU e TANG, 2017). Além disso, o vírus da Zika, tal como outros *Flavivírus*, é caracterizado por seu genoma formado por uma única fita de RNA de sentido positivo ((+)ssRNA), apresentando um tamanho de 10.794 nucleotídeos que codificam um total de 3.419 aminoácidos (CHAN *et al.*, 2016).

O ciclo replicativo do vírus inicia imediatamente após a penetração do vírus na membrana da célula hospedeira, onde o RNA viral é liberado do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma (LEYSSSEN *et al.*, 2000 *apud* BOROWSKI *et al.*, 2002). Por meio do processo de tradução, o RNA viral codifica uma única e grande precursora da poliproteína viral, com aproximadamente 3.000 a 3.500 aminoácidos que apresenta uma única fase de leitura aberta (do inglês, *Open Read Frame* – ORF). Em seguida, as proteases virais e celulares promovem modificações pós-traducionais no precursor proteico, dando origem, por meio do processo de clivagem, às proteínas estruturais e não-estruturais do vírus (BOLLATI *et al.*, 2010), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Representação do genoma do ZIKV. A poliproteína viral passa por potenciais clivagens, originando as proteínas estruturais: capsídeo viral (C), membrana precursora (prM) e envelope (E), e proteínas não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 dos vírus.



Fonte: Disponível em: [http://viralzone.expasy.org/6756?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species). Acesso em: 16 mar. 2017.

De acordo com Armstrong, Hou e Tang (2017), as proteínas estruturais que consistem em capsídeo viral (C), membrana precursora (prM) e envelope (E) são críticas para a formação do envelope e do capsídeo viral. Já as proteínas não-estruturais (do inglês, *Non Structural* – NS) têm fundamental importância no processo de replicação do vírus, totalizando sete proteínas: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5.

### 1.7 Proteína NS1: caracterização e importância como alvo molecular

Primeiramente descrita como um antígeno solúvel fixador de complemento (do inglês, *Soluble Complement Fixing* – SCF) em células infectadas, a proteína NS1 se tornou a peça chave no campo de pesquisa das infecções causadas por *Flavivírus* (BRANDT *et al.*, 1970; RUSSELL *et al.*, 1970 *apud* XU *et al.*, 2016b).

Durante os últimos trinta anos, a proteína NS1 vem sendo investigada como potencial alvo para vacinas e antivirais contra o vírus da dengue (AMORIM *et al.*, 2014). Esse potencial deve-se, em parte, à expressão da NS1 na superfície de células infectadas, sendo assim considerada como maior marcador antigênico para infecções virais (YOUNG *et al.*, 2000).

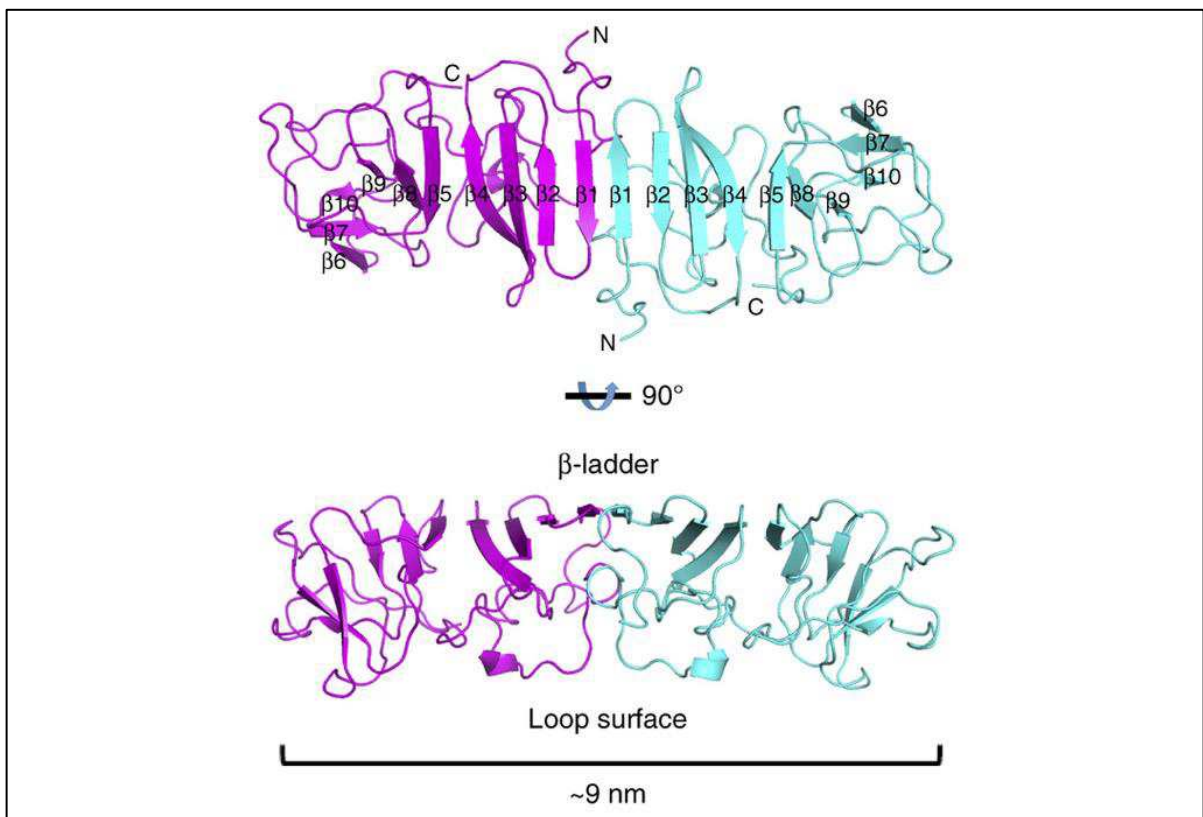
A proteína NS1 dos *Flavivírus*, de peso molecular 46-55kDa, dependendo do seu estado de glicosilação, é classificada como uma glicoproteína N-ligada não estrutural altamente conservada, com seis ligações dissulfeto intramoleculares invariáveis (EDELING, DIAMOND e FREMONT, 2014). Existente na célula como um homodímero, NS1 se separa em três populações distintas, dentre as quais: uma significativa população participa do complexo de replicação do vírus, uma segunda minoria é transportada para a membrana plasmática e por último, uma terceira parcela é secretada no espaço extracelular em forma de um complexo lipoproteico hexamérico (FLAMAND *et al.*, 1999; GUTSCHE *et al.*, 2011; MULLER *et al.*, 2012 *apud* XU *et al.*, 2016b).

Após ser secretada no espaço extracelular, a partícula lipoproteica NS1 participa do processo de evasão imune e patogênese devido à interação com componentes de ambos sistemas imune, inato e adquirido, bem como outros fatores do organismo hospedeiro (AVIRUTNAN, *et al.*, 2010; CHUNG, *et al.*, 2006 *apud* SONG *et al.*, 2016).

Estudos com DENV e WNV realizados por Edeling, Diamond e Fremont (2014), constataram que as proteínas NS1 apresentavam uma superfície denominada *ladder*, na qual se dispunham contínuas folhas- $\beta$  e do lado oposto, uma superfície irregular formada por um arranjo complexo em forma de laço, chamada de superfície *loop* (Figura 3).

Para alguns *Flavivirus*, como DENV e WNV, os mecanismos moleculares da proteína NS1 estão relativamente bem estabelecidos. Porém, para a proteína NS1 do ZIKV estes mecanismos ainda não foram completamente elucidados, o que reflete na divergência em relação à patogênese deste com outros vírus (SONG *et al.*, 2016). Assim, para o seu melhor entendimento, trabalhos foram desenvolvidos com base na expressão da proteína NS1 do ZIKV.

Figura 3 – Superfície ladder ( $\beta$ -ladder) e superfície loop (*loop surface*) da proteína NS1 do vírus da Zika.



Fonte: Modificado de SONG *et al.*, 2016.

Em seu trabalho, Song *et al.* (2016) expressaram um fragmento da proteína NS1, proveniente de uma cepa brasileira do ZIKV e ao analisá-lo, constatou que a proteína NS1 do ZIKV, assim como a de outros *Flavivirus*, também apresentava superfícies *ladder* e *loop* em sua estrutura, porém em diferentes quantidades e tamanhos. Contudo, após comparar a estrutura da NS1 do ZIKV com a de outros *Flavivirus* (DENV e WNV), constatou-se que sua superfície *loop* continha uma região central carregada positivamente e negativamente e as regiões distais carregadas negativamente, o que diferenciava NS1 do ZIKV dos outros grupos. Com o objetivo de entender esse potencial eletrostático único, um modelo hexaédrico da proteína NS1 do ZIKV foi criado com base em modelagem comparativa. Nesse modelo, a estrutura formada apresentava um orifício hidrofóbico no centro, que poderia acomodar facilmente lipídeos do

hospedeiro, formando um complexo lipoproteico e que a superfície *ladder* das proteínas encontrava-se voltada para dentro, enquanto que do lado oposto, a superfície *loop* voltava-se para fora.

Ambas superfícies da proteína NS1 do ZIKA apresentam um mapa de potencial eletrostático único, o que a leva a interagir com proteínas do hospedeiro diferentes das usadas por DENV e WNV (XU *et al.*, 2016b). Assim, a superfície *loop* apresenta-se como fator crucial para as interações entre a NS1 secretada e os anticorpos e fatores do hospedeiro nos *Flavivirus* em geral (EDELING, DIAMOND e FREMONT, 2014; AVIRUTNAN, *et al.*, 2007 *apud* SONG *et al.*, 2016). Conclui-se então, que o divergente potencial eletrostático dessa proteína no ZIKV pode resultar em propriedades de ligação alterada.

Portanto, usando-se do conhecimento das características únicas da superfície da proteína NS1 do ZIKV, os mecanismos da patogênese desse vírus poderão ser elucidados, proporcionando assim, o desenvolvimento de vacinas e tratamentos antivirais contra o vírus da Zika.

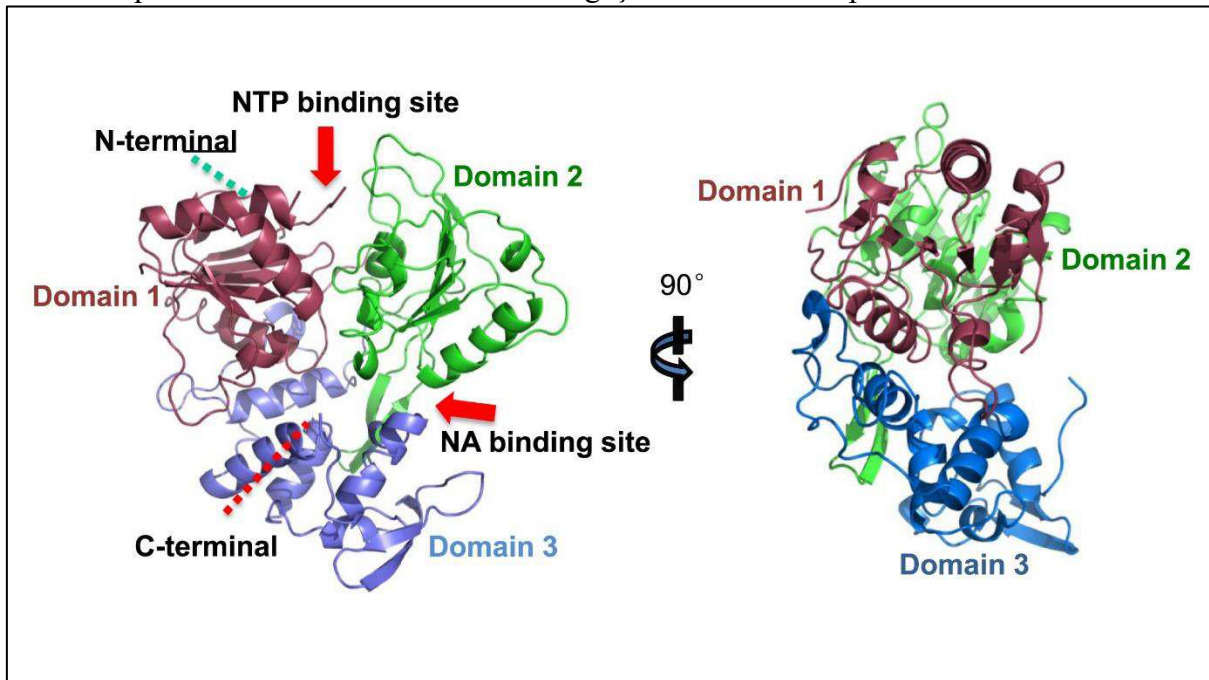
## 1.8 NS3 helicase: um importante alvo molecular

A proteína NS3 é um componente multifuncional de fundamental importância para a replicação do genoma viral, além de atuar no processamento do polipeptídeo dos *Flavivirus* e, junto a outras proteínas virais, formar complexos ligados à membrana (SALONEN, AHOLA e KAARIANEN, 2005; TAY *et al.*, 2015 *apud* CAO *et al.*, 2016).

Estruturalmente, NS3 contém um domínio serina protease em sua porção N-terminal, que requer a presença da proteína não estrutural NS2B para que sua propriedade proteásica esteja ativa (TAY *et al.*, 2014). Em sua porção C-terminal, NS3 apresenta um domínio RNA-helicase, que é dependente de nucleotídeos trifosfatados (NTPs). Perante estimulação por RNA, este domínio exibe atividade nucleosídeo trifosfatase (NTPase) que proporciona a hidrólise dos NTPs, fornecendo assim, energia química para desenrolar os intermediários da replicação do RNA viral, junto à proteína NS5 (CAO *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016).

A partir de trabalhos desenvolvidos por Cao *et al.* (2016), Jain *et al.* (2016) e Tian *et al.* (2016), foi determinado que a região da NS3 helicase/NTPase do ZIKV é composta por três domínios de tamanhos aproximadamente iguais, nos quais estão localizadas fendas entre domínios adjacentes (Figura 4). A estrutura da helicase apresenta cavidades nas quais se acoplam partículas que são críticas para sua função.

Figura 4 – Estrutura do domínio de helicase da proteína NS3 do ZIKV. Os três domínios são indicados por diferentes cores e os sítios de ligação são indicados pelas setas em vermelho.



Fonte: Modificado de CAO *et al.*, 2016.

Nas fendas localizadas entre os Domínios I e II, encontra-se o sítio ativo da NTPase. Com a ligação e catálise dos NTPs em uma das cavidades, a helicase exibe uma variedade de conformações estruturais que diferem entre os *Flavivírus*. De acordo com Tian *et al.* (2016), a helicase do ZIKV não sofre um rearranjo significativo quando passa para o seu estado ativo, assim como as do DENV, além de poder usar diferentes fontes de NTPs (como ATP e GTP) como substratos para prover energia para desenrolar o RNA durante a replicação viral.

Cao *et al.* (2016) observaram que a ligação de cátions metálicos bivalentes no sítio ativo das helicases para ajudar na hidrólise da molécula de NTP, era uma propriedade particular das proteínas NS3 dos *Flavivírus*. Ademais, estudos sugerem que os metais bivalentes apresentam papéis alostéricos reguladores na proteína, promovendo a ligação de NTP e o rearranjo estrutural local.

Além do sítio ativo de NTPase, a estrutura da helicase do ZIKV apresenta um túnel positivamente carregado, localizado no limite do Domínio III, que interage diretamente com os Domínios I e II, permanecendo extenso o suficiente para acomodar uma única fita de ácido nucleico. No túnel, os resíduos carregados positivamente estabilizam a ligação açúcar-fosfato do ácido nucleico. Assim, quando a helicase em sua forma ativa se liga à molécula de ssRNA, apresenta mudanças conformacionais consideráveis, quando comparada à sua forma inativa, devido a rotação dos Domínios II e III. Além disso, a helicase do ZIKV depende de moléculas de água para que ocorra a ligação com ssRNA, promovendo o reconhecimento de nucleotídeos

individuais. Deste modo, os *Flavivírus* utilizam-se de conservados mecanismos para converter a energia química promovendo a sobrevivência do vírus e, variados modos de reconhecimento da molécula de RNA para adaptar seu mecanismo de replicação de forma particular no organismo (TIAN *et al.*, 2016).

Conclui-se assim, a importância das helicases virais como alvos atrativos para o desenvolvimento de fármacos contra o ZIKV, devido ao seu papel fundamental para a replicação do vírus. Portanto, o desenvolvimento de inibidores que atuam em regiões específicas e essenciais para a replicação viral, enquadra-se como estratégia para a criação de terapias antivirais, bem como os vários inibidores para a helicase de DENV já reportados (SWEENEY *et al.*, 2015 *apud* JAIN *et al.*, 2016).

## 1.9 Readequação de Fármacos

De acordo com o *National Center for Advancing Translational Sciences* (2017) (NCATS), a estratégia de Readequação de Fármacos (do inglês, *Drug Repurposing*) refere-se ao estudo de drogas já aprovadas para o tratamento de uma doença ou condição, para verificar se estas são seguras e efetivas para o tratamento de outras doenças. Portanto, o uso dessa estratégia para acelerar o desenvolvimento de um fármaco, bem como as fases pré-clínica e clínica, permite uma redução expressiva, tanto no custo atrelado ao desenvolvimento de uma nova droga, quanto no tempo, estimado em 14 anos, para que todo procedimento seja realizado.

Iniciar um programa de descoberta de fármacos, no caso de doenças infecciosas que se propagam rapidamente, requer além de um amplo entendimento sobre o vírus e seu mecanismo de ação, um conjunto de informações sobre os organismos relacionados à espécie de interesse. Diante da prioridade global dada ao ZIKV nos últimos anos, a estratégia de readequação de fármacos apresenta-se como uma alternativa para o desenvolvimento de um possível tratamento para os casos de Zika. Utilizando-se das informações de outros *Flavivírus*, como o DENV, e ferramentas computacionais, moléculas com potencial farmacológico ativo podem ser identificadas e testadas contra o vírus de interesse (EKINS *et al.*, 2016a).

### 1.10 Moléculas com potencial farmacológico contra o ZIKV

A escolha de moléculas com potencial farmacológico contra o ZIKV, bem como o estudo do seu comportamento e interação com as proteínas virais são um dos focos do presente trabalho.

Segundo o trabalho desenvolvido por Xu *et al.* (2016a), a infecção das hNPCs pelo ZIKV resulta no aumento da ativação da enzima caspase-3, seguida pela morte celular. Em seus estudos, Xu *et al.* (2016a) realizaram ensaios de triagem com possíveis compostos farmacológicos, provenientes da *Library of Pharmacologically Active Compounds* (LOPAC) e NCATS, utilizando como parâmetro a viabilidade de células alvo e a atividade da caspase-3. A partir dos resultados, foram identificadas duas classes de compostos que eram capazes de proteger as células neurais da morte induzida pelo ZIKV, sendo uma delas constituída por compostos antivirais por natureza e outra por composto neuroprotetores. Dentre os compostos antivirais escolhidos, Niclosamida e PHA-690509 tiveram suas atividades confirmadas por meio da redução dos níveis de RNA intracelular do ZIKV após a fase de entrada do vírus na célula, provavelmente na etapa de replicação viral.

A Niclosamida é um fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) que tem sido utilizada, por aproximadamente 50 anos, para o tratamento de infecções causadas por vermes, além de ser conhecido como inibidor de vários vírus em cultura, incluindo o *Flavivirus Japanese encephalitis* (LI *et al.*, 2014).

A atividade antiviral da Niclosamida é atribuída principalmente à sua capacidade de interferir no pH para a fusão da membrana, que é uma etapa essencial na via comum de entrada do vírus. No entanto, análises sugerem que a inibição por Niclosamida ocorre em uma etapa pós-entrada, como por exemplo, a replicação do vírus. Estudos realizados em animais demonstraram que a Niclosamida não oferece risco para o feto, apresentando uma baixa toxicidade em mamíferos, representando assim, um avanço para o tratamento das infecções causadas pelo ZIKV em mulheres grávidas. Afirmando essa característica, a Organização Mundial de Saúde recomenda como seguro o uso da Niclosamida durante a gravidez, já que esta não demonstrou ser mutagênica, teratogênica ou tóxica para o embrião. Além disso, o uso da Niclosamida não se restringe aos tratamentos em mulheres grávidas, podendo ser também utilizada potencialmente para reduzir a carga viral em homens e mulheres infectados, e para prevenir a GBS e outras complicações neurológicas relacionadas ao ZIKV (XU *et al.*, 2016a).

O composto PHA-690509 age como inibidor de quinase dependente de ciclina (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor* - CDKi), estando este ainda em processo de investigação

para ser aprovado pela FDA. As CDKs são fatores chave para os processos de progressão celular, em vista de que desempenham papéis importantes no controle da divisão celular e modulam a transcrição em resposta a vários sinais extra e intracelulares (MALUMBRES, 2014). Assim, afirma-se a importância das CDKs para o ciclo de vida dos vírus nas células humanas, e o consequente papel dos inibidores de CDKs como potenciais bloqueadores da replicação do vírus. Sabendo-se que os Flavivírus não são capazes de sintetizar CDKs, sendo esses organismos dependentes de uma ou mais CDKs do hospedeiro para a sua replicação, sugere-se que o composto PHA-690509, agindo como um CDKi, atua inibindo a replicação e a produção do ZIKV na célula. Porém, o uso desse composto não é indicado no período de gestação, devido aos efeitos potencialmente perigosos sobre o feto. No entanto, o uso de compostos inibidores de CDKs podem ser úteis para o tratamento de mulheres infectadas com o vírus, fora do período da gestação, que apresentam risco aumentado de GBS e/ou outras complicações, além de casos onde o ZIKV foi detectado no sêmen de homens mesmo meses após os sintomas agudos da doença terem desaparecido (XU *et al.*, 2016a).

### 1.11 Ferramentas computacionais

As interações de macromoléculas (proteínas, DNA e RNA) com outras macromoléculas e pequenos ligantes são de extrema importância para o entendimento de fundamentais processos biológicos, assim como para o processo de descoberta de moléculas com potencial farmacológico (KOZAKOV *et al.*, 2015).

Atualmente, estratégias computacionais permeiam todos os aspectos do processo de descoberta de fármacos. Técnicas de *Virtual Screening* (VS) são utilizadas para otimizar processos, diminuindo custos e aumentando a eficácia. O *docking* molecular é um dos métodos mais comuns de VS utilizado para o *design* de drogas baseado na estrutura das moléculas. Vários programas baseados em diferentes algoritmos têm sido desenvolvidos para realizar estudos de *docking*, tornando-o uma crescente e importante ferramenta no campo da pesquisa farmacêutica (MENG *et al.*, 2011).

O *docking* molecular, também conhecido como docagem ou ancoragem molecular, é descrito como uma abordagem computacional usada para modelar a interação a nível atômico entre uma proteína e pequenas moléculas ou entre proteína-proteína, permitindo a caracterização do comportamento dessas moléculas (ligantes) no sítio de ligação da proteína alvo, além de elucidar fundamentais processos bioquímicos (MCCONKEY, SOBOLEV e EDELMAN, 2002).

O processo de docagem consiste em duas etapas principais: predição da conformação do ligante, bem como a sua orientação e posição no sítio de ligação da proteína; e a avaliação da afinidade de ligação formada pelo complexo proteína-ligante. A Teoria “*induced-fit*”, criada por Koshland, para elucidar o mecanismo de ligação receptor-ligante, afirma que o sítio ativo de uma proteína é constantemente remodelado pelas interações com os ligantes, conforme interagem com a proteína. Assim, essa teoria sugere que o ligante e o receptor devem ser tratados como flexíveis durante o *docking*. No entanto, considerando a limitação de recursos computacionais, o *docking* tem sido realizado com um ligante flexível e um receptor rígido por um longo tempo, e permanece sendo o método mais usado atualmente (MENG *et al.*, 2011).

## 1.12 Justificativas

O século XXI tem sido marcado pelo reaparecimento de diversas doenças causadas por vírus de RNA, que em casos mais severos podem levar a óbito, como é o caso do vírus da dengue, Chikungunya e, principalmente, o vírus da Zika. O surto de viroses causadas pelo vírus da Zika tem se espalhado em um ritmo muito avançado pelas Américas e de acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil foi um dos países mais afetados pelo vírus dentre os países da América Latina (MUMTAZ *et al.*, 2016).

Além disso, o aumento dramático do número de casos de crianças nascidas com microcefalia no território brasileiro, possivelmente associados com o vírus, colocou a ZIKA como prioridade global da saúde pública (EKINS *et al.*, 2016b). Assim, surgiu a necessidade de desenvolver tratamentos efetivos em um curto período de tempo que garantam além da recuperação de pacientes já contaminados com o vírus, a prevenção da infecção em grupos de risco. Neste contexto, a bioinformática surge como ferramenta para acelerar o desenvolvimento de moléculas com potencial farmacológico que consigam inibir a replicação do vírus da Zika e que sejam aprovadas para um tratamento futuro, em curto período de tempo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar as regiões “drogáveis” em proteínas do vírus da Zika, particularmente as proteínas não estruturais NS1 e NS3, bem como realizar a análise da viabilidade dos ligantes Niclosamida e PHA-690509 como possíveis moléculas terapêuticas, por meio da avaliação das interações proteína-ligante resultantes do *docking* molecular.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Selecionar as estruturas cristalizadas das proteínas não-estruturais NS1 e NS3 do ZIKV;
- b) Definir as cavidades drogáveis dos cristais das proteínas alvo, bem como o perfil eletrostático das mesmas;
- c) Realizar o *docking* molecular dos cristais das proteínas NS1 e NS3 com seus ligantes;
- d) Analisar os complexos de menor energia gerados pelo *docking*, bem como as interações entre o ligante e a cavidade da proteína.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Determinação dos alvos moleculares

No presente trabalho, o passo inicial teve como foco o estudo e análise das proteínas do vírus da Zika, bem como suas funções nas etapas essenciais à reprodução do vírus no organismo hospedeiro.

Com base na literatura existente e no entendimento das proteínas do ZIKV e suas funções, as proteínas não-estruturais NS1 e NS3 foram selecionadas como alvos moleculares para o *docking* e, por meio da utilização de ferramentas de bioinformática, seus sítios de ligação foram definidos e, posteriormente, utilizados como parâmetro para o *docking* molecular.

#### 3.2 Seleção dos cristais das proteínas não-estruturais NS1 e NS3

Após a determinação dos alvos moleculares, as estruturas cristalizadas das proteínas NS1 e NS3 do ZIKV foram obtidas do Banco de Dados de Proteínas (do inglês, *Protein Data Bank* - PDB). O PDB é um repositório de informações mundial sobre as estruturas tridimensionais de moléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos, estando publicamente disponível para a comunidade global, atuando como centro de deposição, processamento e distribuição de dados (BERMAN *et al.*, 2000).

Os cristais das proteínas foram selecionados com base em diferentes critérios, dentre eles: a presença de ligantes, a origem da cepa onde a proteína foi extraída e a resolução do cristal (com valores até 3Å).

Dentre os cristais da proteína NS1 depositados no PDB, o cristal de código de acesso 5GS6 (XU *et al.*, 2016b) foi selecionado. A origem da cepa a partir da qual o mesmo foi extraído, no caso de origem brasileira, e a sua resolução de 2.85Å, foram os critérios utilizados para a seleção do cristal 5GS6.

Para a proteína NS3, dois cristais foram selecionados: 5GJB (TIAN *et al.*, 2016) e 5GJC (TIAN *et al.*, 2016), estando ambas as estruturas acopladas à ligantes, sendo estes as moléculas de ssRNA e ATP, respectivamente. A princípio, a escolha do cristal 5GJB (resolução 1.7Å) deveu-se principalmente à presença do domínio helicase na porção C-terminal da proteína NS3, já que esse, quando exposto à molécula de ssRNA, sofre modificações conformacionais exibindo atividade enzimática, promovendo a replicação viral, o que torna essa área de ligação uma possível região drogável.

Em seguida, o cristal 5GJC (resolução de 2.2Å) foi escolhido devido à presença da molécula de ATP em sua estrutura, que ao ligar-se ao domínio NTPase da proteína NS3 provê a energia necessária para desenrolar a fita de RNA durante a replicação viral. Assim, a escolha dessa área como região drogável, teoricamente, impediria a ligação da molécula energética e, conseqüentemente, o processo de replicação do vírus, o que a torna um interessante alvo.

### 3.3 Definição dos sítios de ligação dos cristais das proteínas NS1 e NS3

Conhecer a localização do sítio de ligação da proteína antes do processo de *docking* molecular aumenta significativamente a eficiência da docagem. Para isso, diversos servidores e programas de detecção de cavidades são disponibilizados para a identificação dos sítios ativos nas proteínas (MENG *et al.*, 2011).

Dentre os métodos computacionais disponíveis, o *metaPocket* (HUANG, 2009) foi utilizado para prever os possíveis sítios de ligação dos cristais das proteínas NS1 e NS3 do vírus da Zika.

O *metaPocket* é uma plataforma online que trabalha em compilação com oito outros métodos: *LIGSITEcs* (HUANG e SCHROEDER, 2006), *PASS* (BRADY e STOUTEN, 2000), *Q-SiteFinder* (LAURIE e JACKSON, 2005), *SURFNET* (LASKOWSKI, 1995), *Fpocket* (GUILLOUX, SCHMIDTKE e TUFFERY, 2009), *GHECOM* (KAWABATA, 2009), *ConCavity* (CAPRA *et al.*, 2009) e *POCASA* (YU *et al.*, 2009), para melhorar a taxa de sucesso de predição dos sítios de ligação na molécula. Ele permite que o usuário escolha o número mínimo de cavidades a serem visualizadas na proteína e, após a submissão dos arquivos, as seqüências dos aminoácidos nos sítios de ligação das proteínas são disponibilizadas.

Os arquivos PDB dos cristais das proteínas selecionadas previamente (5GS6, 5GJB, 5GJC) foram submetidas ao *metaPocket*, versão 2.0. O servidor requer na página inicial que o usuário submeta o arquivo PDB ou o PDB ID da proteína, e em seguida informe o número de cavidades desejadas a serem visualizadas na molécula. Para o presente estudo foram escolhidas e analisadas três cavidades, sendo apenas uma delas escolhida como alvo.

Após a submissão, o software informa as coordenadas dos mais prováveis sítios de ligação das cavidades encontradas, dado este gerado pela análise dos oito servidores que usam diferentes métodos. Apenas uma cavidade e sua respectiva coordenada foi selecionada para cada proteína.

Para selecionar a melhor cavidade, os arquivos gerados em PDB pelo *metaPocket*, com as respectivas cavidades encontradas, foram exportados para o programa *Pymol* versão

1.8.6.0, onde as três cavidades de cada proteína foram analisadas e em seguida apenas uma cavidade foi escolhida como alvo para o *docking*.

As cavidades encontradas foram representadas por estruturas em malha de diferentes cores padronizadas, para facilitar a identificação e visualização da posição que ocupam na superfície da proteína. A esfera referente ao primeiro *pocket* encontrado (nomeado MPT1) foi colorida de laranja, a segunda (MPT2) de vermelho e a terceira (MPT3) e última de magenta. A cavidade escolhida teve os valores de suas coordenadas anotados para o posterior uso no *docking* molecular.

Em seguida, o servidor online *FTMap* (KOZAKOV *et al.*, 2015) foi utilizado para confirmar os resultados fornecidos inicialmente pelo *metaPocket*.

O *FTMap* identifica por meio do mapeamento computacional, regiões na superfície das moléculas com maior contribuição para energia livre de ligação com um possível ligante. Assim como o *metaPocket*, esse servidor identifica as porções das moléculas que são mais importantes para formar ligações, determinando a *drogabilidade* de uma proteína (KOZAKOV *et al.*, 2015).

Os arquivos em formato PDB dos cristais selecionados para as proteínas NS1 e NS3 do ZIKV foram então submetidos ao *FTMap* e os arquivos gerados foram exportado para o *Pymol* 1.8.6.0 e analisados segundo a mesma metodologia usada para o *metaPocket*.

### 3.4 Perfil eletrostático das cavidades das proteínas NS1 e NS3

A habilidade de avaliar o perfil eletrostático de biomoléculas, possibilita prever o comportamento de um ligante em uma região específica da proteína. Assim, o entendimento das interações eletrostáticas é essencial para o desenvolvimento de moléculas com potencial farmacológico.

O software APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) (BAKER *et al.*, 2001) foi utilizado para a análise do perfil eletrostático predominante nas cavidades dos cristais das proteínas NS1 e NS3 do ZIKV.

O APBS é um pacote de software que utiliza a plataforma do programa *Pymol* para a visualização de seus resultados. Ele calcula, por meio da equação de Poisson-Boltzmann (PBE), as propriedades eletrostáticas de moléculas com dezenas a milhões de átomos (BAKER *et al.*, 2001).

Para a análise dos cristais das proteínas NS1 e NS3, foi estabelecido um campo de perfil eletrostático entre -3 e +3kT/e, o que possibilitou uma melhor visualização dos perfis positivos e negativos.

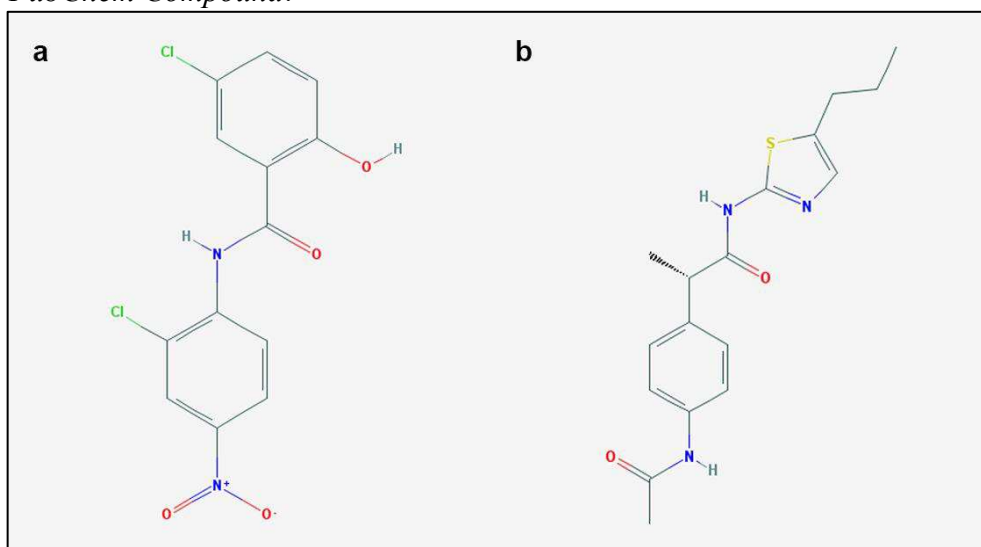
As regiões da proteína que assumem a cor vermelha apresentam um perfil eletrostático mais negativo; as que assumem a cor azul são mais positivas; e as regiões em branco apresentam um perfil neutro.

### 3.5 Seleção e preparo dos ligantes para o *docking* molecular

Para o presente estudo, com base no trabalho desenvolvido por Xu *et al.* (2016a), as moléculas de Niclosamida ( $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$ ) e PHA-690509 ( $C_{17}H_{21}N_3O_2S$ ) foram selecionadas como ligantes para o *docking* molecular devido as suas propriedades farmacológicas antivirais que agem diretamente no processo de replicação do vírus, comprometendo a sobrevivência do ZIKV na célula hospedeira.

As estruturas bidimensionais das moléculas de Niclosamida e PHA-690509 (Figura 5) foram obtidas do *PubChem Compound* (KIM *et al.*, 2015) e em seguida foram preparadas para o *docking* molecular usando o programa *MarvinSketch* versão 16.5.2. Nessa etapa, as estruturas bidimensionais das moléculas foram importadas para o *MarvinSketch* 16.5.2 e seus estados de protonação foram analisados em um faixa de pH de 1-14. Em seguida, foi feita a verificação das possíveis estruturas dos ligantes em pH fisiológico, sendo suas formas predominantes nesse pH selecionadas e usadas para o *docking* molecular.

Figura 5 – Moléculas de (a) Niclosamida e (b) PHA-690509 obtidas pelo *PubChem Compound*.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 30 mar. 2017

### 3.6 Docking molecular

O programa *AutoDock Vina* (VINA) (TROTT e OLSON, 2009) foi utilizado para verificação do melhor local de interação entre as proteínas do ZIKV e os ligantes selecionados, através do *docking* molecular de suas estruturas. O objetivo do *docking* é identificar os melhores modos de ligação da molécula do ligante no sítio de ligação (regiões “drogáveis”) das proteínas alvo, analisando o uso dessas moléculas como potenciais inibidores competitivos.

O *AutoDock Vina* é um programa utilizado para *docking* molecular e *virtual screening* (VS) que melhora significativamente a acurácia dos modos de ligação e tende a ser mais rápido em ordem de magnitude, diminuindo significativamente o tempo de corrida, em comparação com o *AutoDock 4* (TROTT e OLSON, 2010). Além disso, o VINA é uma ferramenta de fácil uso, onde tudo que é requerido é a estrutura das moléculas que estão sendo ancoradas e a especificação do espaço de busca (do inglês: *search space*), incluindo o sítio de ligação.

Os arquivos de entrada selecionados para o *docking*, em formato PDBQT (extensão do arquivo PDB), foram os cristais das proteínas NS1 e NS3 e as formas predominantes em pH fisiológico dos ligantes Niclosamida e PHA-690509, determinadas previamente pelo *MarvinSketch* 16.5.2.

Os cristais 5GJB e 5GJC (proteína NS3) tiveram que ser modificados, pois estavam em complexo com as moléculas de ssRNA e ATP, respectivamente. Assim, essas moléculas que ocupavam o sítio de ligação dos cristais, foram retiradas com auxílio do *Pymol*, para garantir a eficiência do *docking*. A estrutura do cristal 5GS6 da proteína NS1 foi mantida, já que não apresentava nenhum ligante.

Para cada *docking*, após a submissão dos arquivos de entrada no VINA é necessário fornecer as coordenadas referentes ao sítio de ligação das proteínas, que no presente trabalho foram determinadas pelas análises com o *metaPocket* e *FTMap*.

Em seguida, o programa requer que as especificações da superfície de busca do sistema de coordenadas do receptor (proteína) sejam fornecidas, sabendo-se que quanto menor essa área, mais facilmente será explorada pelo algoritmo do *docking*. Por outro lado, se este espaço for muito pequeno, a flexibilidade do ligante e das cadeias laterais dos seus átomos não serão devidamente exploradas. Portanto, a dimensão de 30x30x30 Å (espaço grande o suficiente para o ligante rotacionar) foi escolhida como a mais favorável para o *docking*.

O parâmetro *exhaustiveness*, que consiste no número de corridas (do inglês, *runs*) realizadas pelo docking partindo de uma conformação inicial aleatória, foi ajustado para 80.

Outro parâmetro que deve ser definido para o VINA é o número de modos de ligação desejados. Para o presente estudo, foram definidos dez modos de ligação para cada *docking*.

No total foram realizadas seis docagens, já que para cada um dos três cristais foram gerados dois *dockings* (com os ligantes Niclosamida e PHA-690509). Para os dados resultantes do *docking* de cada proteína, os valores de cada energia de interação ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ ) de cada complexo formado foram plotados em gráficos. As análises foram realizadas somente para as conformações de menor energia para cada complexo proteína-ligante, com o programa *Maestro Schrödinger* versão 11.0.

O software *Maestro* foi utilizado para as análises tridimensionais das interações formadas entre os ligantes e os sítios de ligação das proteínas dos complexos de menor energia resultante do docking. As interações entre as moléculas dos ligantes e os aminoácidos da cavidade proteica foram indicadas por linhas tracejadas em amarelo, indicando uma distância de 1.0 Å a 2.0 Å entre os pares de átomos das moléculas, e laranja, indicando uma distância de 2.0 Å a 3.0 Å. Em seguida, para cada um desses complexos, o diagrama de interação foi gerado e as ligações formadas entre a proteína e o ligante puderam ser melhor analisadas. O *cut off* foi ajustado para 4 e as ligações de hidrogênio foram representadas por setas: as setas contínuas indicando que a ligação ocorre entre os pares de átomos da cadeia principal e as setas tracejadas indicando que ocorre entre os pares de átomos da cadeia lateral da molécula.

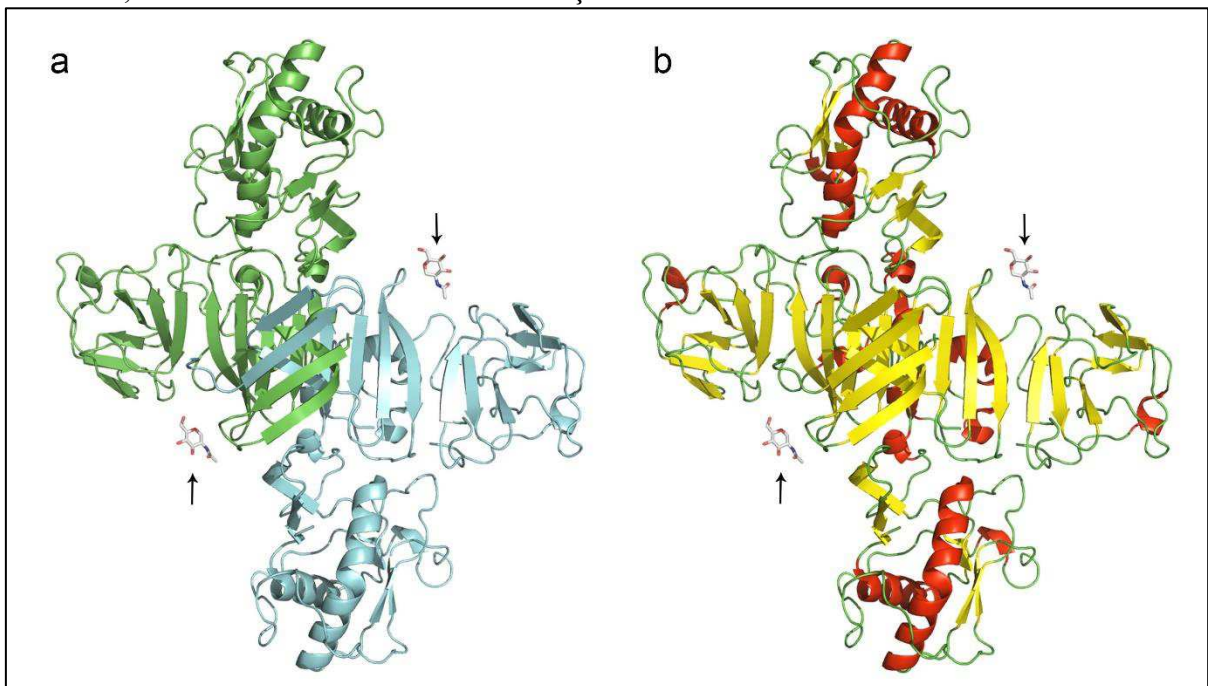
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise dos cristais das proteínas não-estruturais NS1 e NS3 do ZIKV

A visualização da estrutura dos cristais das proteínas permitiu uma melhor compreensão dos vários níveis organizacionais e da função das proteínas NS1 e NS3 no ZIKV. Essas estruturas foram visualizadas pelo *Pymol* 1.8.6.0 e representadas tanto por suas cadeias, quanto por suas estruturas secundárias.

A princípio, o cristal 5GS6 da proteína NS1, de 357 resíduos de aminoácidos, foi analisado, constatando-se a presença de duas cadeias simétricas e opostas na molécula (indicadas pelas cores verde e azul) nas quais estavam ligadas duas moléculas de N-acetil-D-glicosamina (NAG), indicada pela seta na Figura 6.

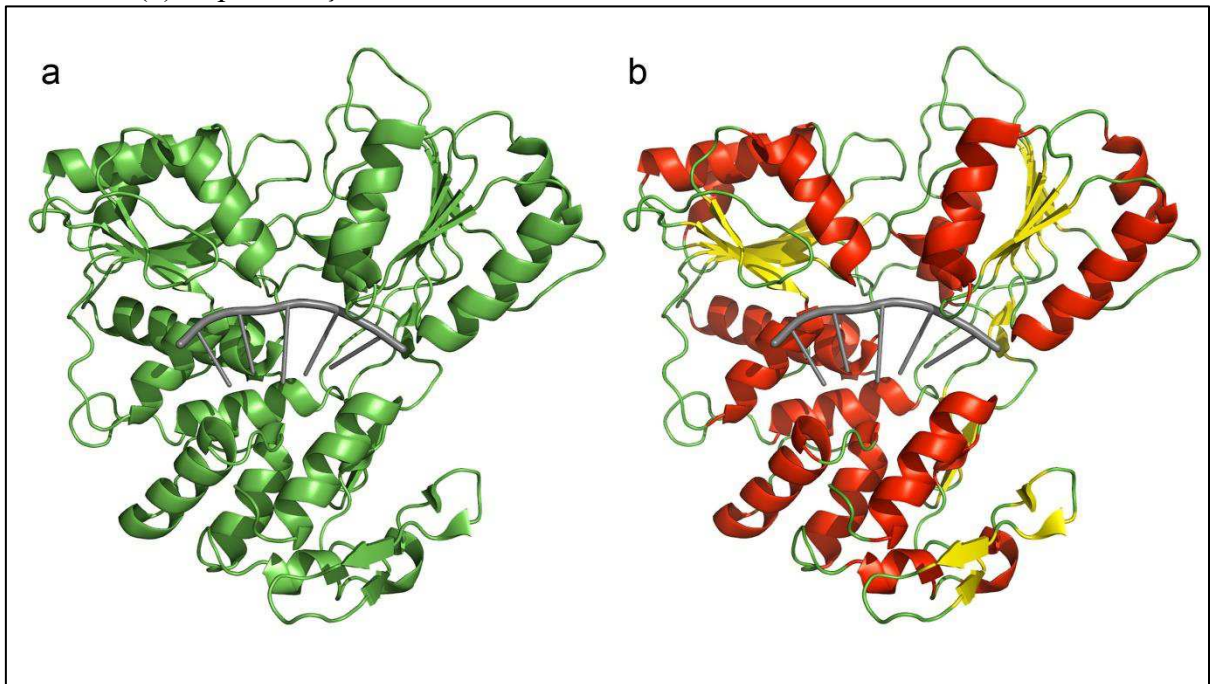
Figura 6 – Cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV ligado as moléculas de NAG, assinalados pelas setas. (a) Representação do cristal em cadeias, indicadas pela cor verde e azul. (b) Representação da estrutura secundária do cristal, onde as alfas hélices estão indicadas em vermelho, as folhas betas em amarelo e as alças em verde.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Em seguida, a análise do cristal 5GJB (Figura 7) da proteína NS3, de 450 aminoácidos, constatou que o cristal apresenta apenas uma cadeia, representada pela cor verde. O cristal apresentava, em sua região central, uma molécula de ssRNA, a qual foi isolada em complexo com o cristal.

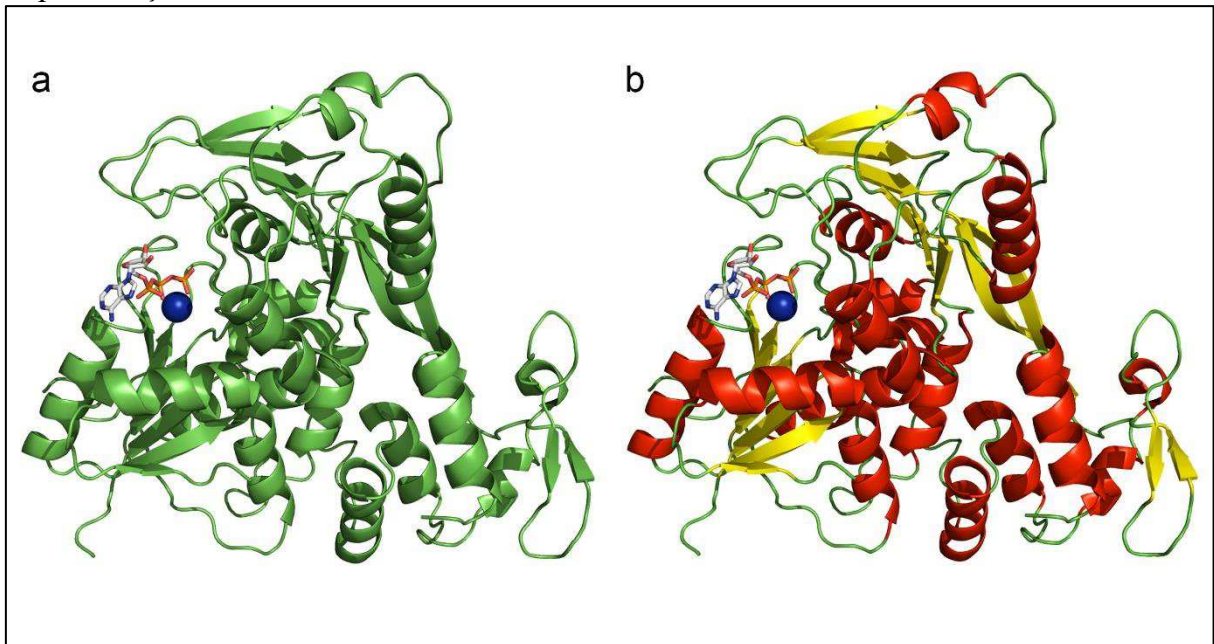
Figura 7 – Cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV em complexo com a molécula de ssRNA, indicada pela estrutura de cor cinza, na região central da molécula. (a) Representação em cadeia do cristal. (b) Representação da estrutura secundária do cristal.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

O segundo cristal selecionado para a proteína NS3, 5GJC (Figura 8), de 442 aminoácidos, apresentou uma única cadeia (Figura 8a), assim como o cristal 5GJB (também da proteína NS3). Ligados ao cristal, uma molécula de ATP ( $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ) e um íon manganês ( $Mn^{2+}$ ) que tem como função estabilizar ligação do ATP com a proteína, foram identificados e representados pela estrutura em formato de bastão e pela esfera de cor azul, respectivamente. Vale ressaltar que ambos os ligantes se encontravam em posições diferentes aos da molécula de ssRNA no cristal 5GJB da proteína NS3.

Figura 8 – Cristal 5GJC da proteína NS3 do ZIKV em complexo com uma molécula de ATP (indicada pela estrutura em forma de bastão), e ao íon manganês (indicado pela esfera de cor azul). (a) Estrutura mostrando a única cadeia do cristal, indicada pela cor verde. (b) Representação da estrutura secundária do cristal.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

## 4.2 Determinação dos sítios de ligação dos cristais das proteínas NS1 e NS3 do ZIKV

Os sítios de ligação dos cristais das proteínas NS1 e NS3, preditos pelos servidores online *metaPocket* e *FTMap*, foram analisados individualmente, para facilitar a visualização e interpretação de suas estruturas.

### 4.2.1 Cavidades encontradas para o cristal 5GS6 da proteína NS1

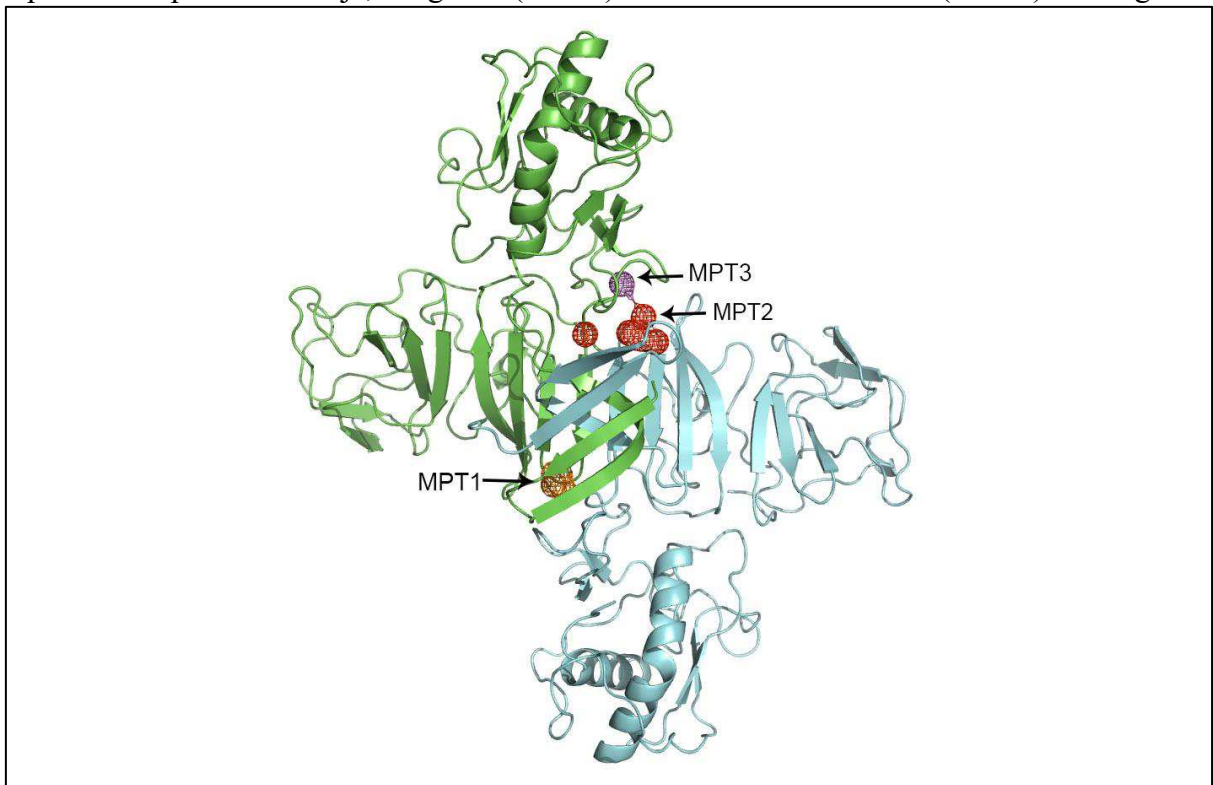
O cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV foi o primeiro a ter seus sítios de ligação visualizados e analisados pelo *metaPocket* e *FTMap*.

As imagens resultantes da análise com o *metaPocket*, foram geradas representando o cristal tanto por suas cadeias (em verde e azul), quanto por sua superfície (Figura 9), para garantir a melhor visualização das cavidades encontradas (Figura 10), possibilitando assim, a escolha da melhor região para o *docking molecular*.

Como determinado na metodologia do presente trabalho, os seus três sítios de ligação (preditos pelo *metaPocket*) foram denominados: MPT1, MPT2 e MPT3, indicadas por estruturas em malha de cores padronizadas em laranja, vermelha e magenta, respectivamente.

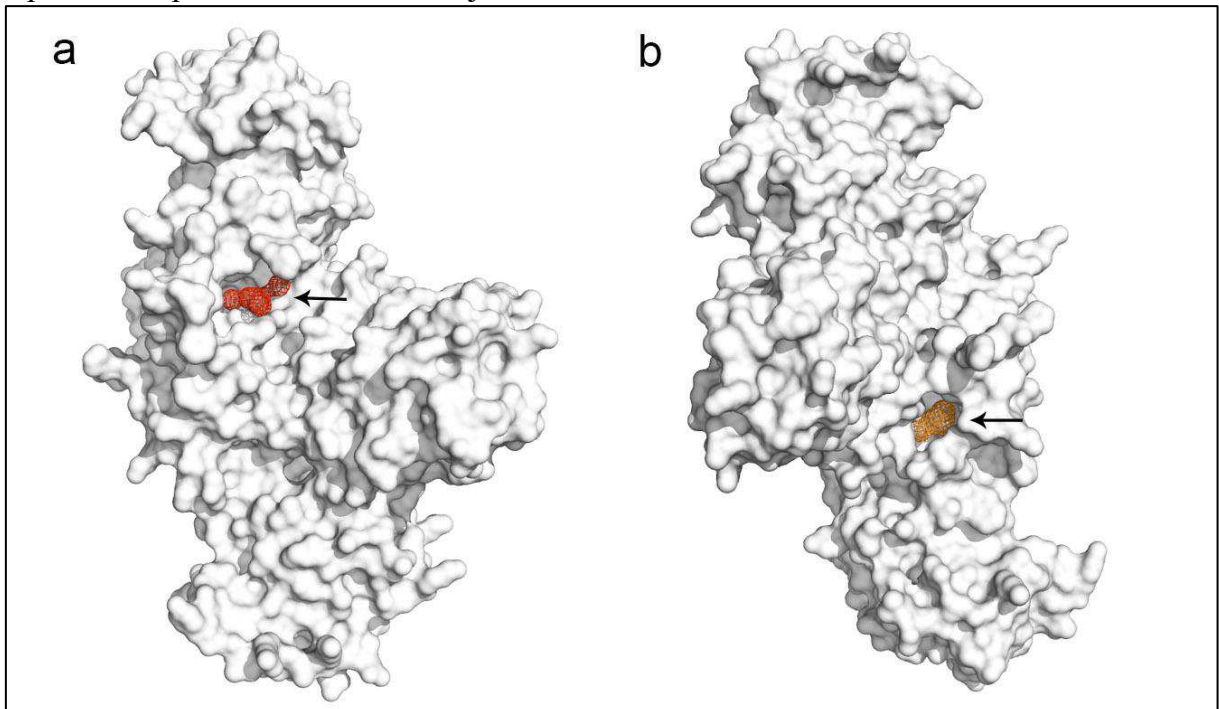
Dentre as cavidades encontradas pelo *metaPocket* (Figura 9 e 10), o MPT 2 (cor vermelha), apresentou-se mais exposto à superfície da molécula quando comparado ao MPT 1 (cor laranja). A cavidade referente ao MPT 3, foi excluída como região alvo devido a sua posição na proteína, já que esta se encontrava voltada para o interior da molécula, o que dificultaria a associação com um possível ligante. Portanto, a cavidade MPT2 foi pré-selecionada como região alvo para o *docking* molecular.

Figura 9 – Cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV, mostrando as cavidades encontradas pelo *metaPocket*, em diferentes cores indicadas pelas setas. A primeira cavidade (MPT1) está representada pela cor laranja, a segunda (MPT2) em vermelho e a terceira (MPT3) em magenta.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Figura 10 – Superfície do cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV com suas respectivas cavidades indicadas pelas setas. (a) Estrutura do cristal mostrando a cavidade MPT2 representada pela malha em cor vermelha. (b) Estrutura do cristal mostrando a cavidade MPT1 representada pela malha de cor laranja.

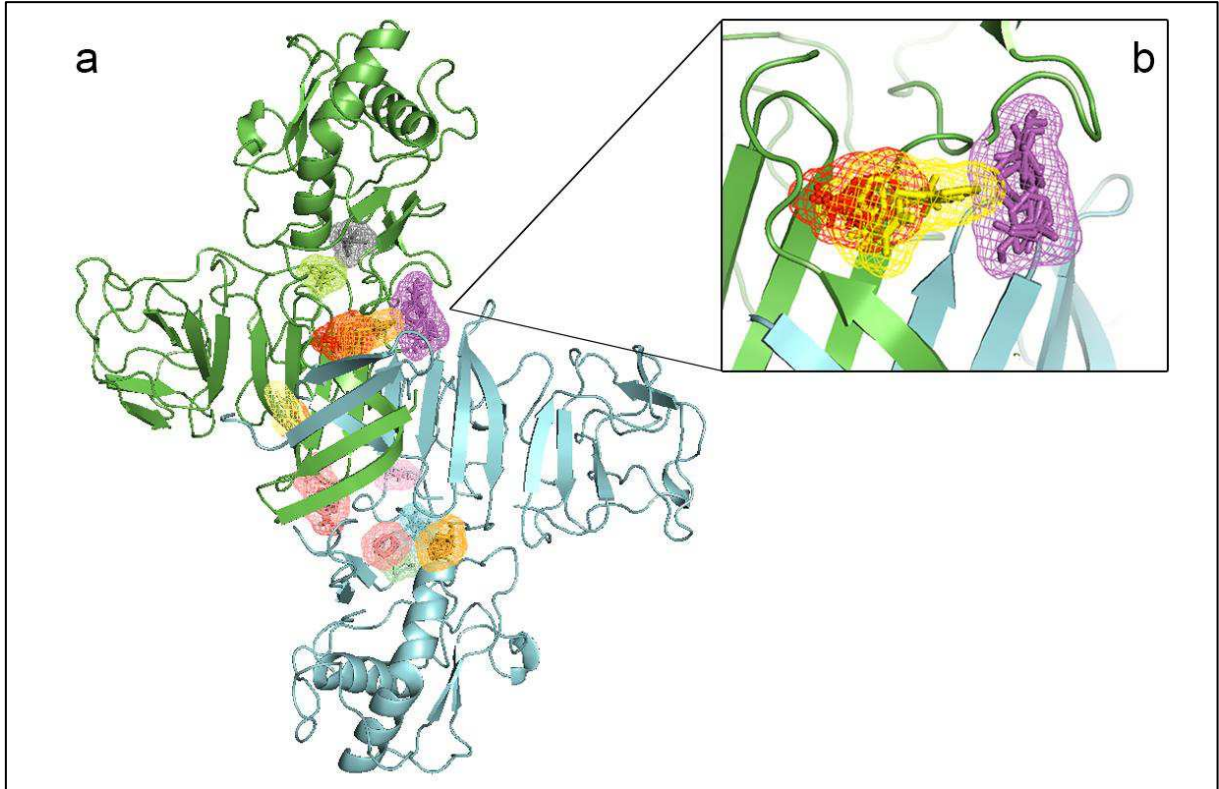


Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

A fim de assegurar que a cavidade mais acessível do cristal 5GS6 seria escolhida, seus arquivos (em formato PDB), foram submetidos ao *FTMap*, o qual encontrou 13 cavidades que foram comparadas com as encontradas pelo *metaPocket*.

O *Pymol* foi usado para a visualização do cristal e das cavidades preditas pelo *FTMap*, cada uma representada por diferentes cores (Figura 11). As três primeiras cavidades encontradas pelo programa foram representadas pelas cores laranja, vermelha e magenta, respectivamente. Como visto na Figura 11b, a localização das três primeiras cavidades coincidiu com a cavidade MPT2 identificada, anteriormente, pelo *metaPocket*, confirmando assim a escolha dessa região como alvo. Assim, suas coordenadas foram anotadas e utilizadas posteriormente para o *docking* molecular.

Figura 11 – Cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV e suas respectivas cavidades identificadas pelo FTMap. (a) Cristal 5GS6 com um total de 13 cavidades identificadas por diferentes cores. (b) Estrutura ampliada do cristal 5GS6 mostrando as três primeiras cavidades identificadas, representadas pelas cores laranja, vermelha e magenta, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

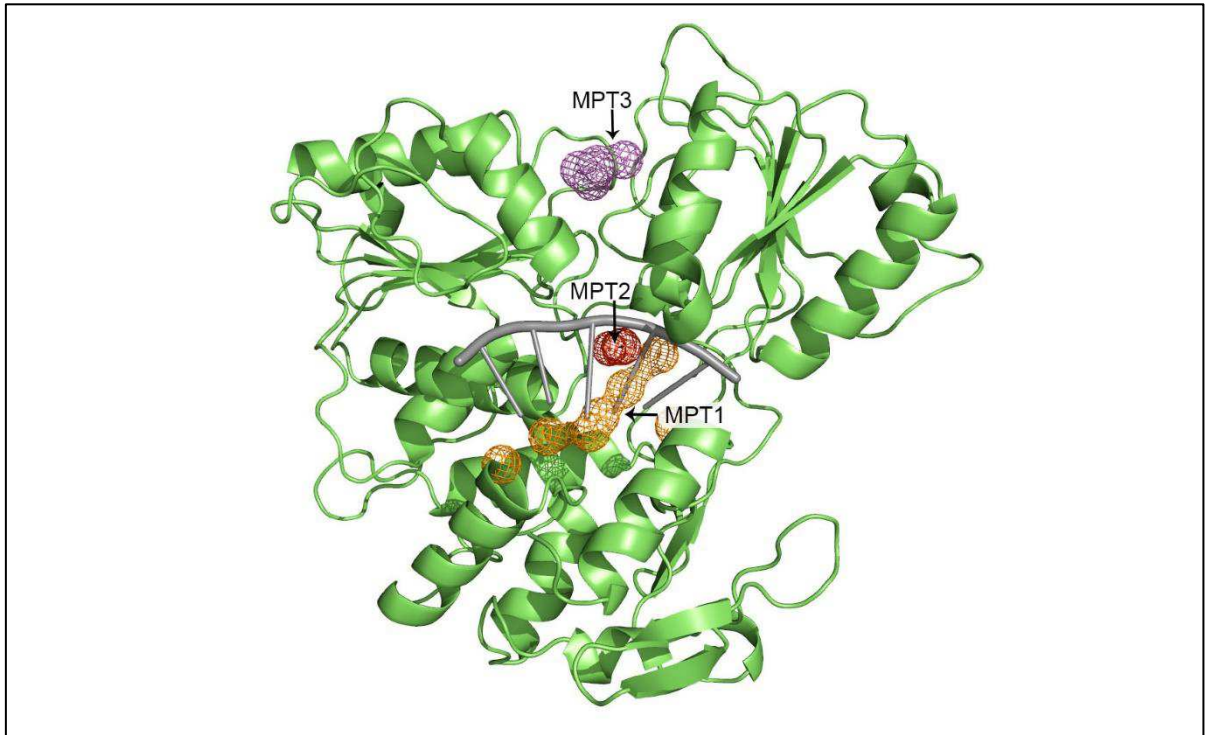
#### 4.2.2 Cavidades encontradas para o cristal 5GJB da proteína NS3

Em seguida, os sítios de ligação encontrados pelo *metaPocket* para o cristal 5GJB da proteína NS3 foram analisados.

Inicialmente, observou-se que dentre as cavidades preditas pelo *metaPocket*, a região onde MPT1 se localiza (indicada em laranja pela seta), coincidia com o ponto de acesso da molécula de ssRNA no cristal da proteína NS3 (Figura 12). Isso tornou a cavidade MPT1 um interessante alvo para o *docking* molecular, tendo em vista que a associação de um possível ligante nessa região provocaria mudanças conformacionais na proteína, impedindo sua ligação com a molécula de ssRNA.

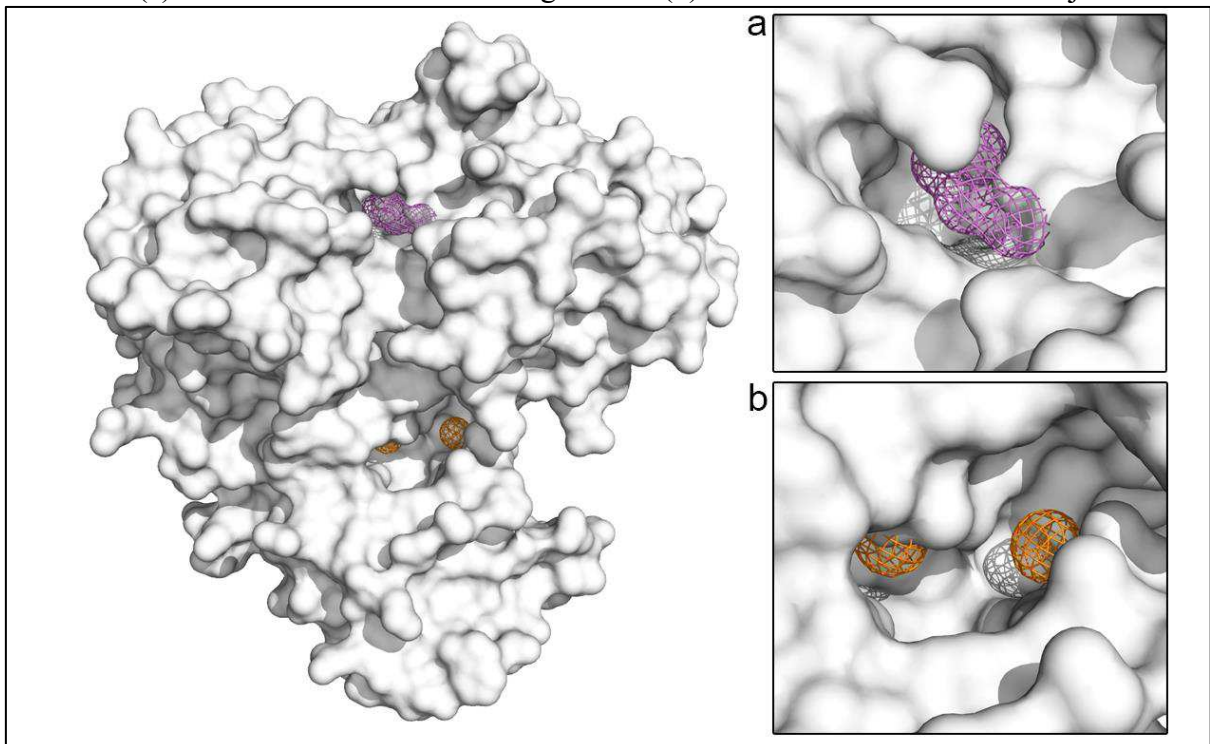
No entanto, ao observarmos a superfície do cristal 5GJB (Figura 13), a cavidade MPT3, representada em cor magenta, apresentou-se mais exposta e acessível, quando comparada à MPT1. Em adição, a localização da cavidade MPT3 coincidia com a cavidade encontrada para o cristal 5GJC (também da proteína NS3).

Figura 12 – Cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV e suas cavidades, MPT1, MPT2 e MPT3, indicadas pelas cores laranja, vermelho e magenta, respectivamente. Molécula de ssRNA representada pela estrutura de cor cinza no centro do cristal.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

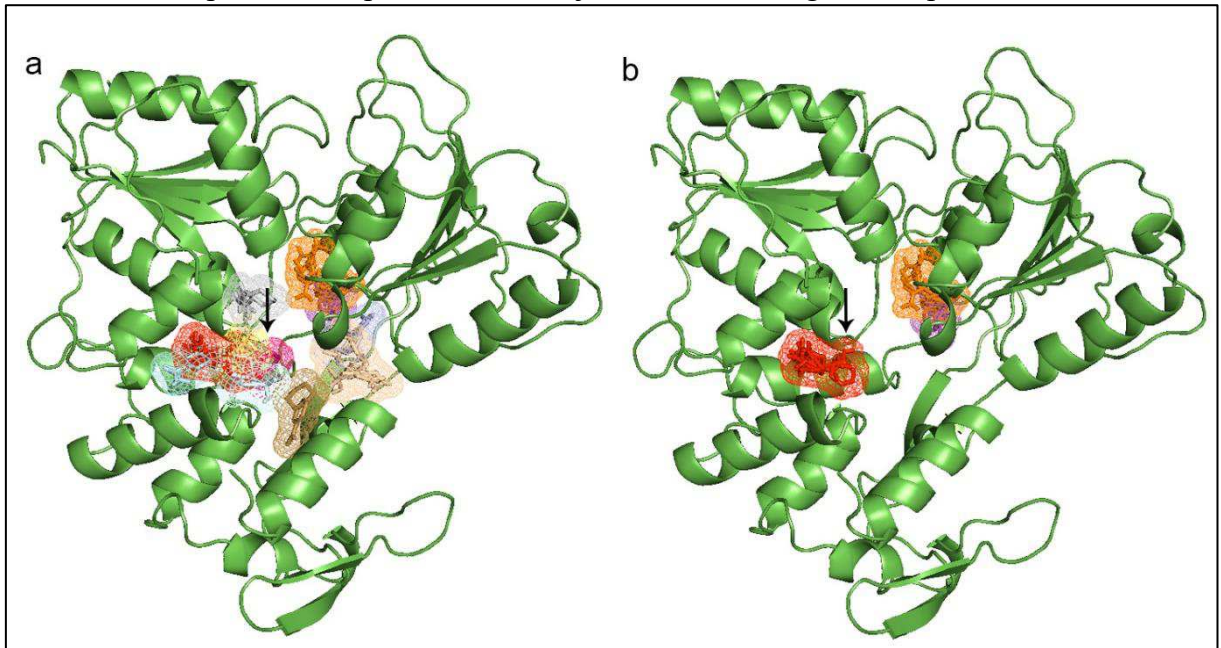
Figura 13 – Superfície do cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV com as cavidades MPT1 e MPT3 indicadas pelas cores laranja e magenta, respectivamente. Superfície ampliada do cristal indicando (a) a cavidade MPT3 de cor magenta e a (b) cavidade MPT1 de cor laranja.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

A fim de assegurar que a melhor cavidade do cristal 5GJB fosse escolhida, seus arquivos, em formato PDB, foram submetidos ao *FTMap*, o qual encontrou 11 cavidades e foram representadas por diferentes cores, como visto na Figura 14. As três primeiras cavidades foram representadas pelas cores laranja, vermelha e magenta, respectivamente (Figura 14b).

Figura 14 – Cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV e suas respectivas cavidades identificadas pelo FTMap indicadas pela seta. (a) Estrutura do cristal com um total de 11 cavidades identificadas por diferentes cores. (b) Estrutura do cristal mostrando as três primeiras cavidades identificadas, representadas pelas cores laranja, vermelha e magenta, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Observou-se também que um aglomerado de cavidades se concentravam na região próxima ao ponto de ligação da molécula de ssRNA, indicada pela seta, (Figura 14a) onde a cavidade MPT1 estava localizada e foi, também, identificada pelo *metaPocket*.

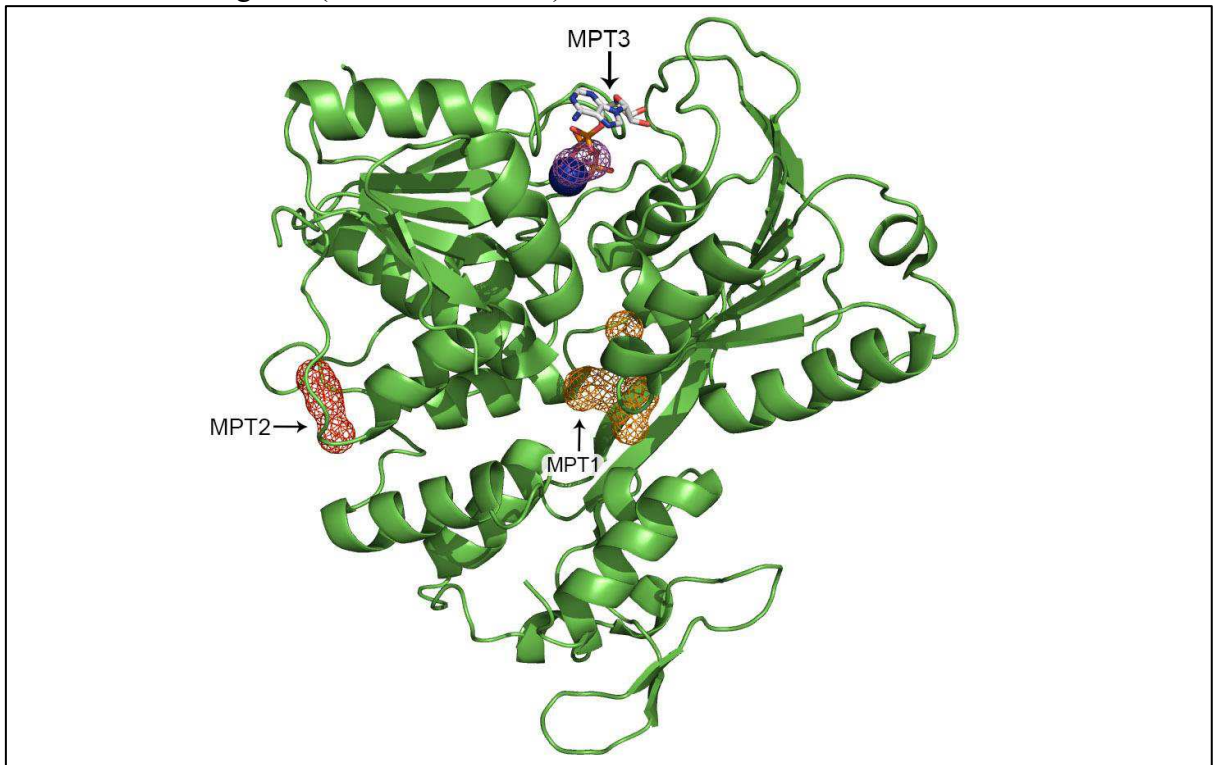
Portanto, a cavidade MTP 1, mesmo sendo visualmente menos acessível ao ligante em relação à MPT3, foi escolhida como alvo para o *docking* molecular devido, principalmente, ao fato dessa cavidade coincidir com o sítio de ligação da molécula de ssRNA no cristal. Do mesmo modo, suas coordenadas foram anotadas e utilizadas, *a posteriori*, no *docking* molecular.

### 4.2.3 Cavidades encontradas para o cristal 5GJC da proteína NS3

Por último, o cristal 5GJC (também da proteína NS3 do ZIKV) teve suas cavidades definidas pelo *metaPocket* e analisadas, posteriormente, no *Pymol*.

A partir da análise dos resultados, observou-se que a região onde a cavidade MPT3, de cor magenta, estava localizada coincidia com o local onde a molécula de ATP e íon manganês ( $Mn^{2+}$ ) se ligavam no cristal da proteína (Figura 15).

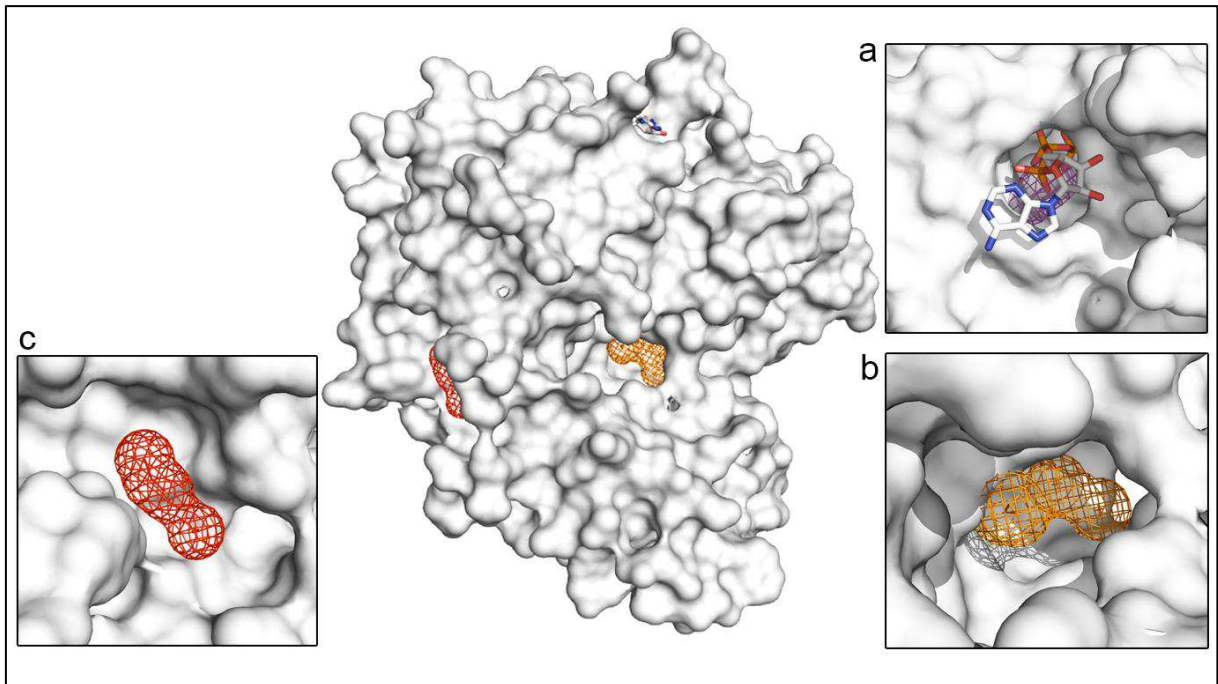
Figura 15 – Cristal 5GJC da proteína NS3 do ZIKV e suas cavidades: MPT1, MPT2 e MPT3, indicadas pelas cores laranja, vermelho e magenta, respectivamente. No canto superior da imagem, a seta indica a interação entre a molécula de ATP, representada pela estrutura de cor cinza, e o íon manganês (esfera de cor azul) com a cavidade MPT3.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Quando a superfície do cristal foi analisada (Figura 16), observou-se que a cavidade MPT2 (Figura 16c) apresentava-se mais acessível à superfície externa da molécula. No entanto, a cavidade MPT3 (Figura 16a) também se localizava em uma região visivelmente acessível. Devido à localização dessa cavidade coincidir com a região em que a molécula de ATP se liga no cristal, MPT3 foi escolhida como alvo para o *docking* molecular e suas coordenadas foram anotadas para serem usadas, posteriormente, como centro geométrico do *docking*.

Figura 16 – Estrutura da superfície do cristal com as cavidades MPT1, MPT2 e MPT3 indicadas pelas cores laranja, vermelha e magenta, respectivamente. Superfície ampliada do cristal, mostrando a (a) cavidade MPT3 junto à molécula de ATP, (b) cavidade MPT1 e (c) cavidade MPT2.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

A análise das cavidades pelo *FTMap* já havia sido realizada para o cristal 5GJB da proteína NS3 (Figura 14) e não foram encontradas cavidades compatíveis com a região próxima à cavidade MPT3 identificada pelo *metaPocket*. Assim, essas análises não foram tomadas como referência para a escolha da cavidade do cristal 5GJC.

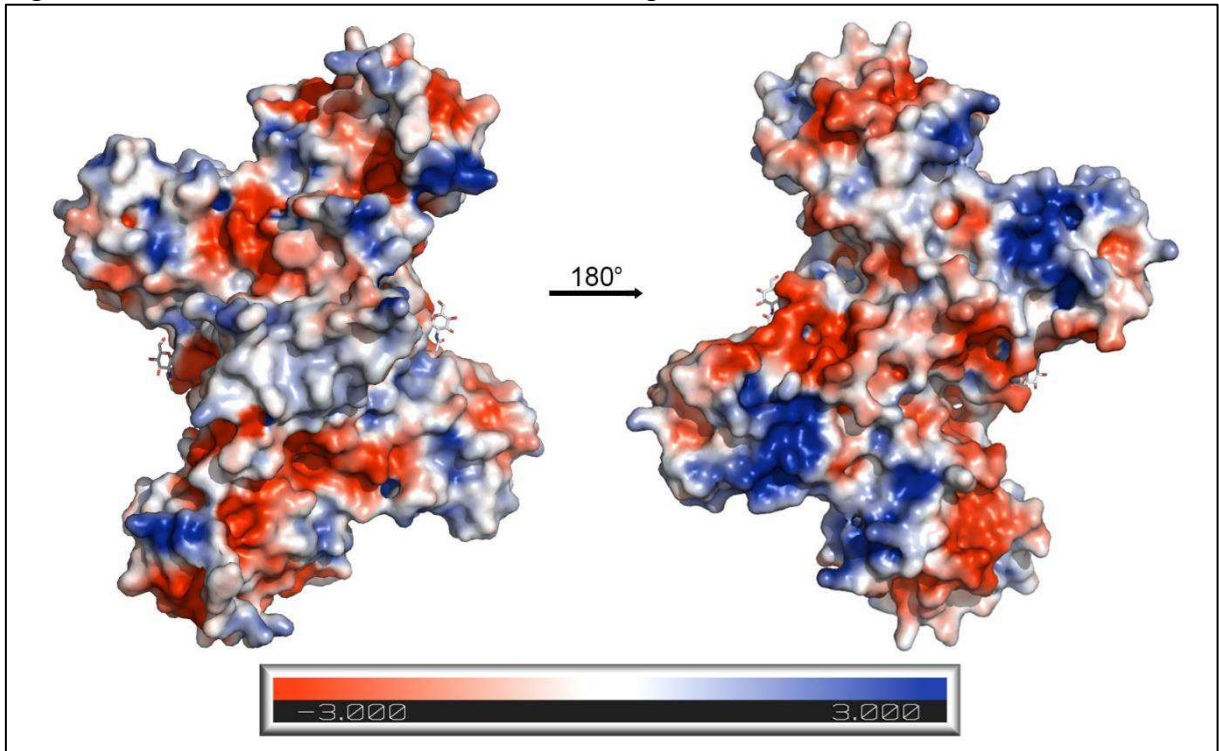
### 4.3 Análise do perfil eletrostático dos cristais das proteínas NS1 e NS3

Com as cavidades já definidas para os cristais das proteínas NS1 e NS3 do ZIKV, o passo seguinte se deteve à análise do perfil eletrostático de cada um deles, utilizando o software *APBS* (BAKER *et al.*, 2001).

O cristal 5GS6 da proteína NS1 foi o primeiro a ter o perfil eletrostático definido pelo APBS. Antes da análise, o campo de perfil eletrostático teve que ser ajustado para  $\pm 3$  kT/e o que possibilitou uma melhor visualização dos campos positivo e negativo das proteínas.

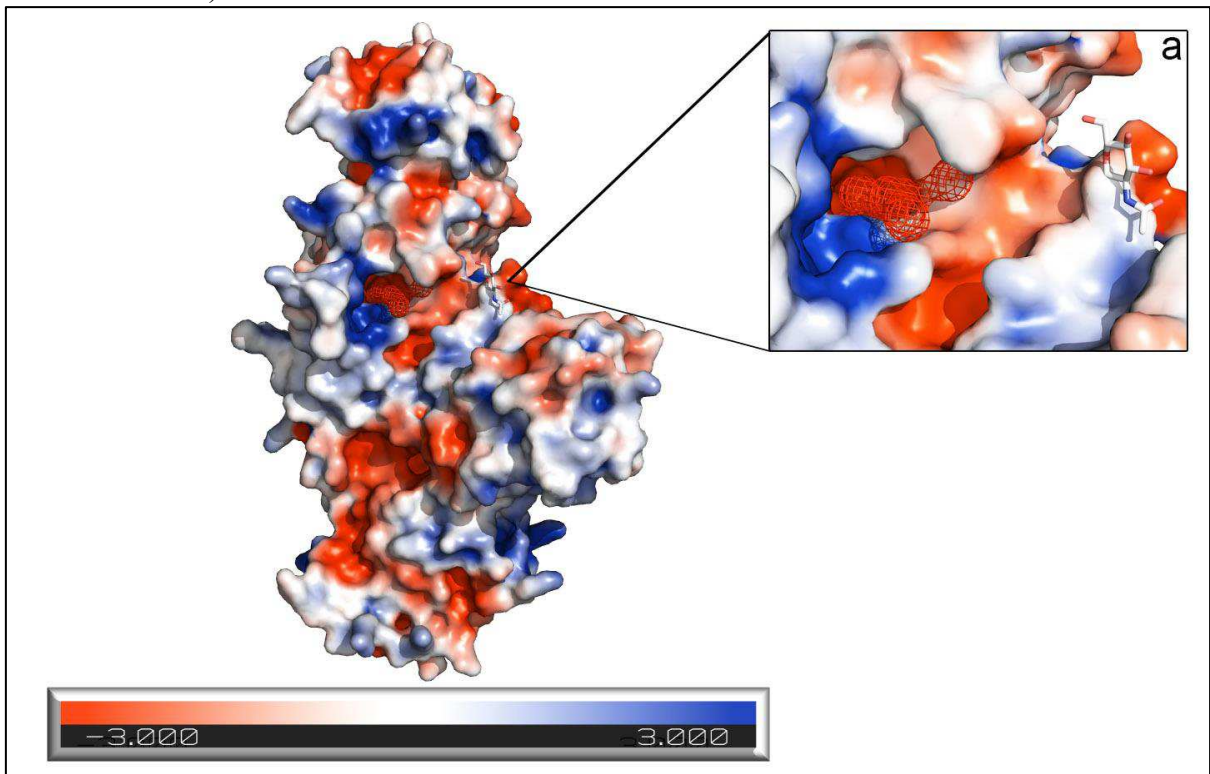
Na porção central do cristal, observou-se um perfil altamente heterogêneo, e em direção às extremidades distais um perfil negativo foi verificado (Figura 17).

Figura 17 – Perfil eletrostático do cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Figura 18 – Perfil eletrostático do cristal 5GS6 da proteína NS1 do ZIKV com a cavidade MPT2 inserida. (a) Imagem ampliada mostrando a região onde a cavidade MPT2 (estrutura em malha de cor vermelha) se encontra no cristal 5GS6.



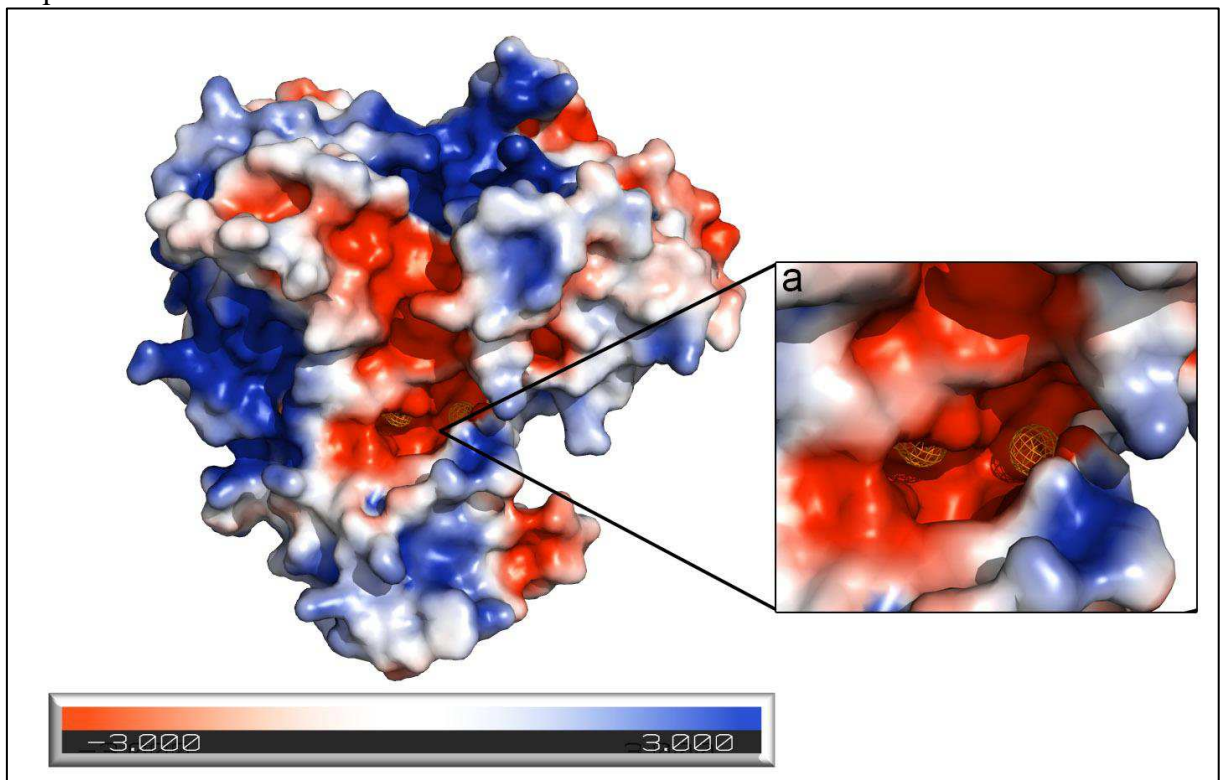
Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Em seguida, a cavidade MPT2 (representada pela malha de cor vermelha) foi adicionada à estrutura do cristal (Figura 18) para que a análise fosse feita de forma mais direcionada para essa região, já que havia sido escolhida como sítio de ligação para o *docking* molecular do cristal 5GS6.

Foi observado que o interior da região onde a cavidade MPT2 se encontra (Figura 18a), apresentava um perfil negativo. No entanto, ao redor da cavidade MPT2 notou-se uma região de perfil predominantemente positivo do lado esquerdo e negativo do lado direito.

O perfil eletrostático também foi gerado para o cristal 5GJB da proteína NS3 (Figura 19) e logo após, a cavidade MPT1 foi adicionada à estrutura do cristal (Figura 19a).

Figura 19 – Perfil eletrostático do cristal 5GJB da proteína NS3 do ZIKV, com a cavidade MPT1 inserida. (a) Região referente à cavidade MPT1 (estrutura em malha de cor laranja) ampliada.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

MPT1, como citada previamente, foi a região escolhida para o *docking* molecular, principalmente, devido a essa cavidade coincidir com o local onde a molécula de ssRNA se liga ao cristal proteico. Assim, a análise do perfil eletrostático foi focada para essa região do cristal.

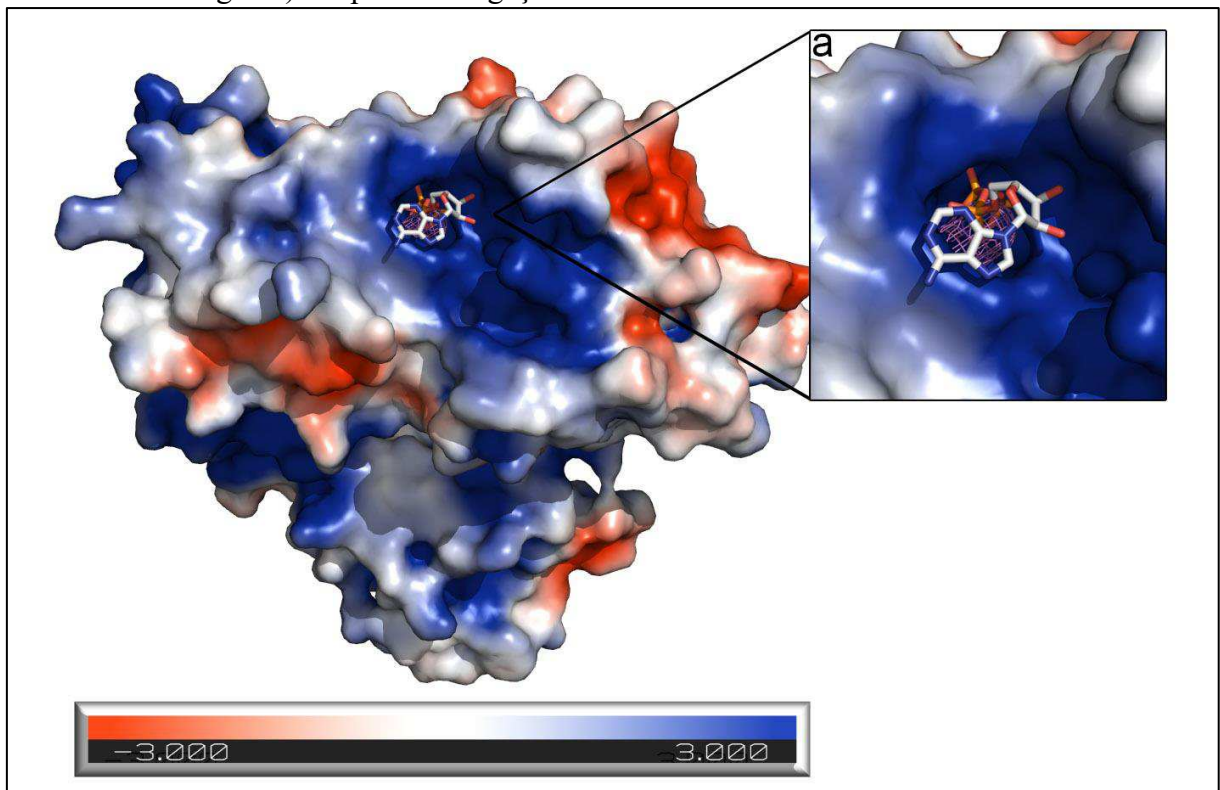
Constatou-se que a região referente à cavidade MPT1 exibia, notavelmente, um perfil eletrostático negativo (Figura 19a). As regiões em torno da cavidade apresentam um perfil

neutro e próximo a estas, regiões com perfil positivo. Portanto, tomando como base a cavidade MPT1 e sua análise, um possível ligante para essa região deverá apresentar carga positiva.

O cristal 5GJC da proteína NS3 do ZIKV foi o último a ter seu perfil eletrostático definido pelo APBS.

Inicialmente, o campo de perfil eletrostático do cristal foi ajustado para  $\pm 3$  kT/e e logo após, sua cavidade MPT3, previamente escolhida como sítio de ligação para o *docking* molecular, foi adicionada à estrutura do cristal (Figura 20).

Figura 20 – Perfil eletrostático do cristal 5GJC da proteína NS3 do ZIKV, com a cavidade MPT3 inserida. (a) Imagem ampliada mostrando a região onde a cavidade MPT3 (estrutura em malha de cor magenta) e o ponto de ligação da molécula de ATP se localizam no cristal.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

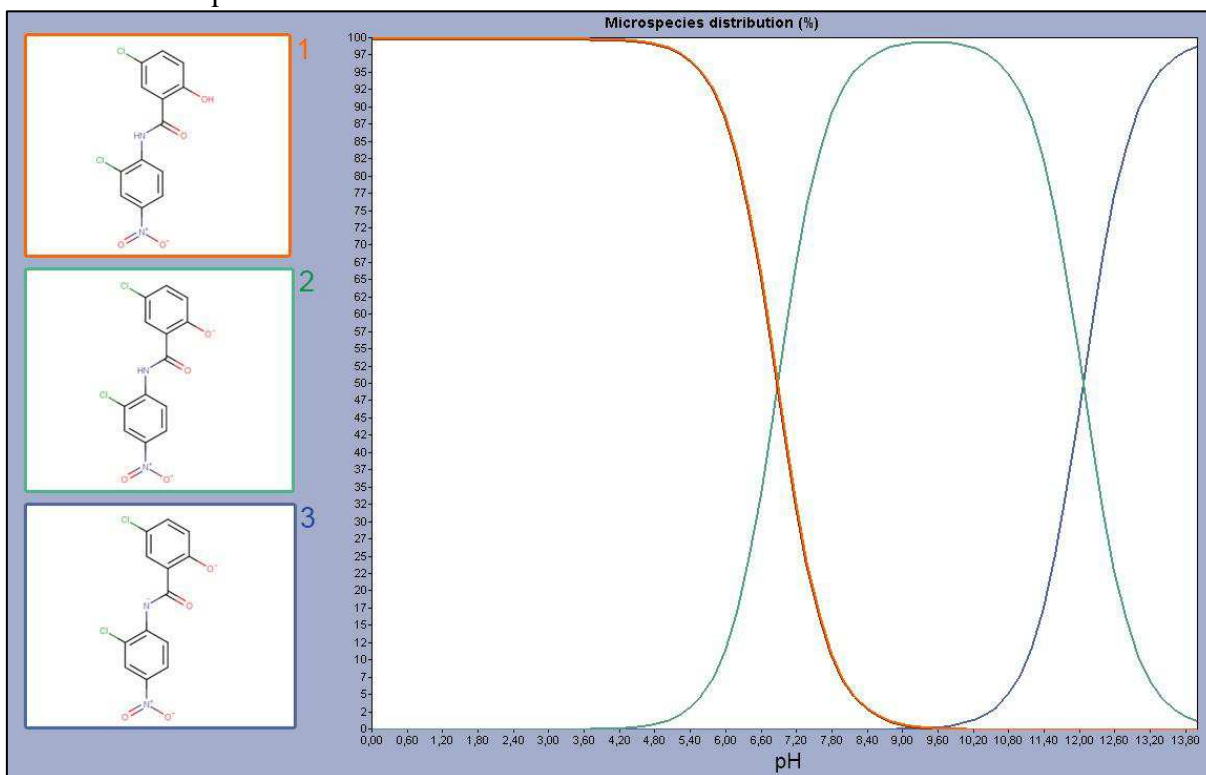
Ao analisar a região da cavidade MPT3 (estrutura em malha de cor magenta) e o ponto de ligação da molécula de ATP ao cristal, observou-se uma coloração predominantemente azul, o que nos permitiu inferir que a região apresentava um perfil positivo (Figura 20a). Assim, um possível ligante para essa região deverá apresentar carga negativa.

#### 4.4 Estado de protonação dos ligantes

As moléculas selecionadas como ligantes apresentam diferentes estados de protonação que dependem diretamente do pH do meio em que se encontram. Assim, para que fosse possível o uso desses ligantes para o posterior *docking* molecular, essas moléculas foram previamente analisadas pelo *Marvin Sketch* v. 16.5.2. Os dados obtidos por esse software, nos permitiu selecionar a estrutura predominante dos ligantes na faixa de pH de interesse, no caso o pH fisiológico (entre 6-7).

Para a molécula de Niclosamida, três estruturas são possíveis dentro da faixa de pH de 0 à 14, como visto na Figura 21, e para o pH de interesse a estrutura que apresenta maior distribuição de microestados é a espécie 1, representada no gráfico pela cor laranja, sendo esta escolhida para o *docking* molecular.

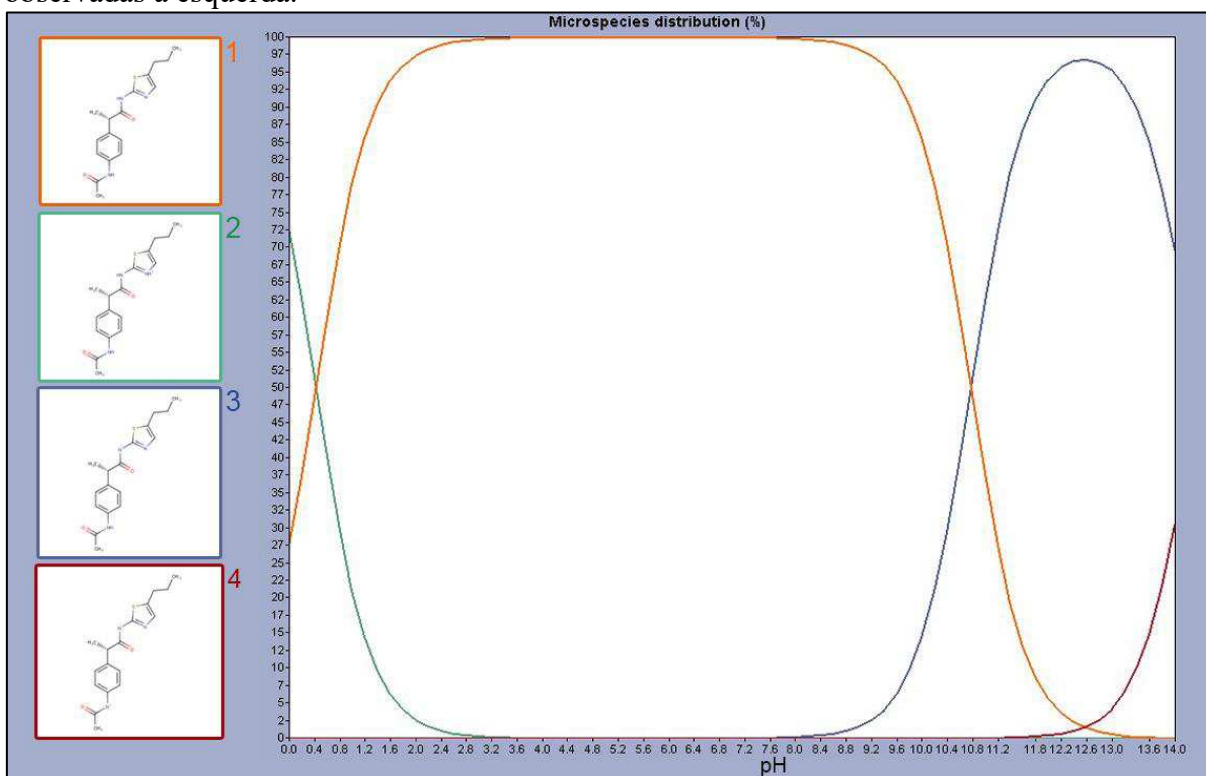
Figura 21 – Distribuição de microestados para a Niclosamida em função do pH e as estruturas observadas à esquerda.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Para a molécula de PHA-690509, quatro estruturas são possíveis dentro da faixa de pH de 0 à 14, como visto na Figura 22. A estrutura 1, representada no gráfico pela cor laranja, apresentou maior distribuição de microestados na faixa de pH de interesse, sendo assim escolhida para o *docking* molecular.

Figura 22 – Distribuição de microestados para o PHA-690509 em função do pH e as estruturas observadas à esquerda.



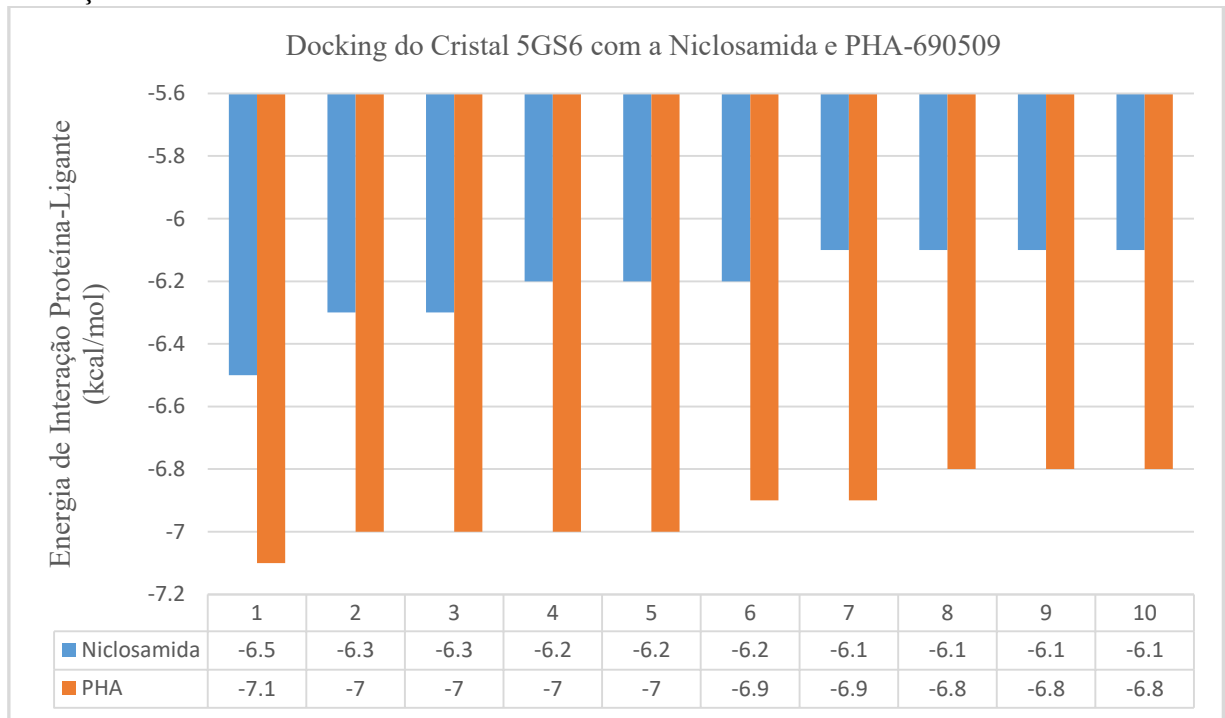
Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

#### 4.5 Análise do *docking* molecular usando o VINA

Com os sítios de ligação dos cristais (5GS6, 5GJB e 5GJC) das proteínas definidos e suas respectivas coordenadas anotadas e com os ligantes preparados, o *docking* molecular foi realizado utilizando o programa *AutoDock Vina* (VINA) (TROTT e OLSON, 2010).

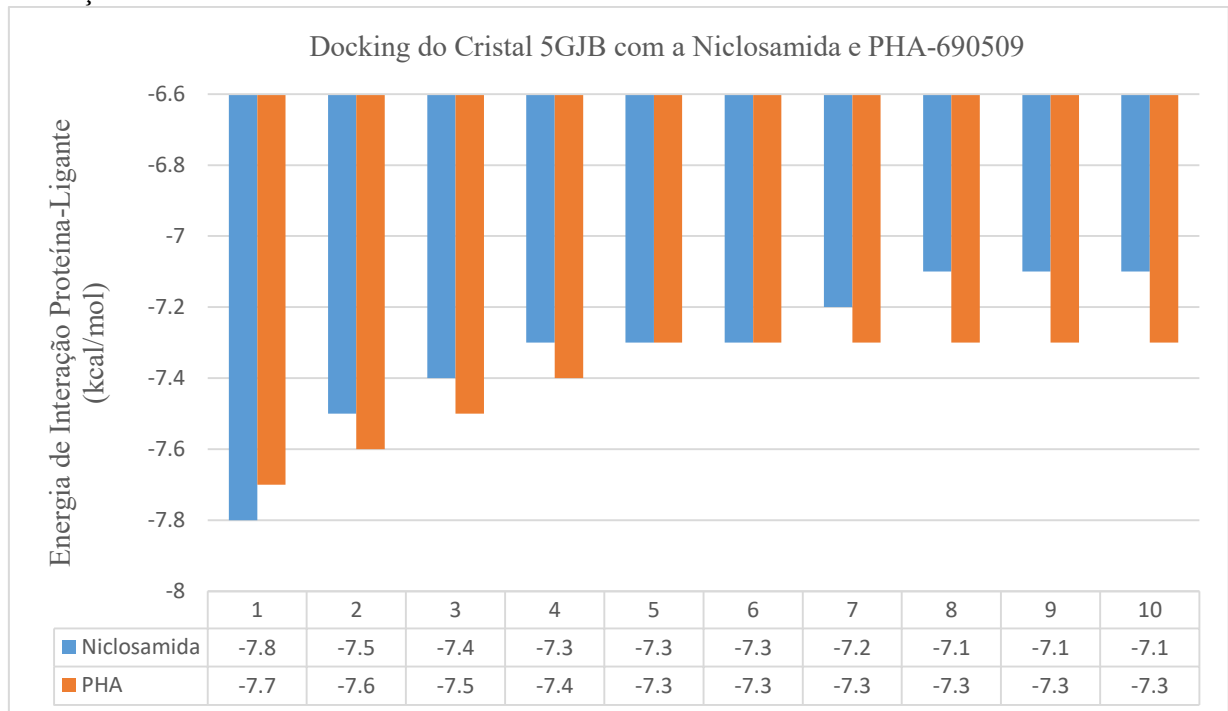
Os dados resultantes do *docking* molecular referente aos modos de ligação entre os cristais das proteínas e seus ligantes e suas respectivas energias de interação foram plotados em gráficos, como vistos nos Gráficos 1, 2 e 3, totalizando dez complexos (proteína-ligante).

Gráfico 1 – *Docking* Molecular do Cristal 5GS6 da proteína NS1 com os ligantes Niclosamida e PHA-690509. Complexos proteínas-ligantes indicados de 1-10 e suas respectivas energias de interação.



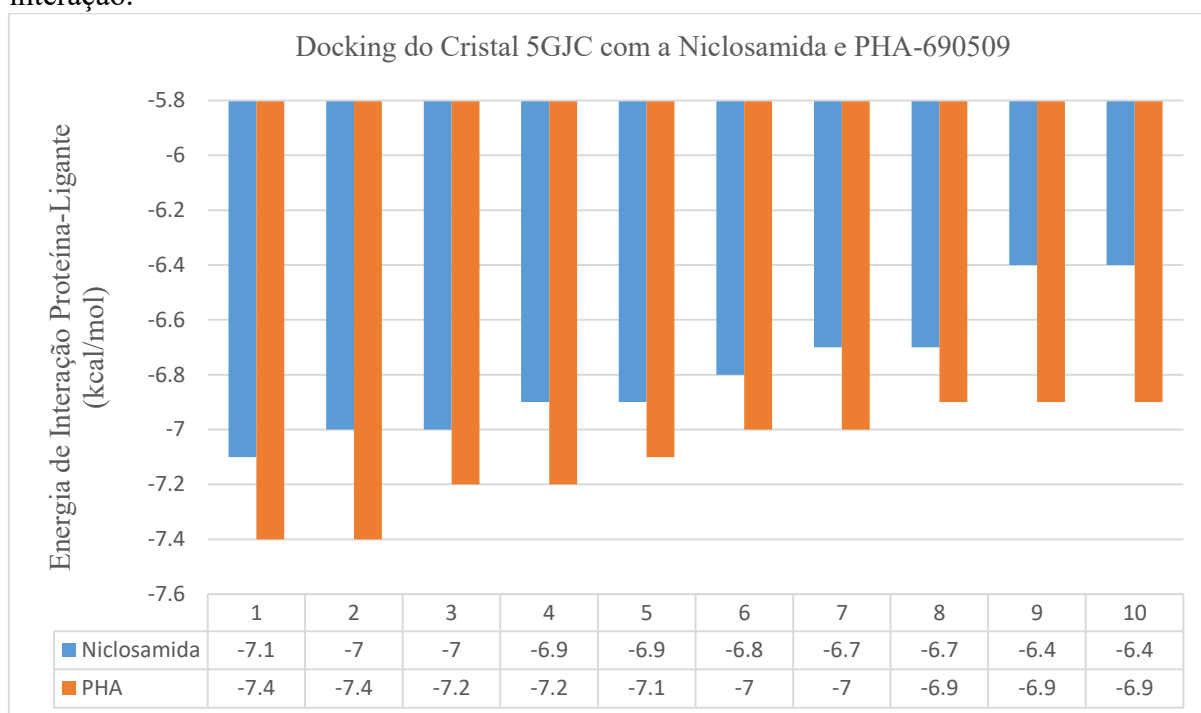
Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Gráfico 2 – *Docking* Molecular do Cristal 5GJB da proteína NS3 com os ligantes Niclosamida e PHA-690509. Complexos proteínas-ligantes indicados de 1-10 e suas respectivas energias de interação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Gráfico 3 – *Docking* Molecular do Cristal 5GJC da proteína NS3 com os ligantes Niclosamida e PHA-690509. Complexos proteínas-ligantes indicados de 1-10 e suas respectivas energias de interação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Posteriormente, a energia de interação de cada complexo foi analisada e as conformações de menor energia foram selecionadas. Assim, para cada cristal e seu respectivo ligante um único complexo foi selecionado e analisado, resultando em um total de dois complexos por cada cristal, já que o *docking* ocorreu com dois ligantes.

#### 4.5.1 Análise dos complexos proteína-ligante de menor energia usando o *Maestro*

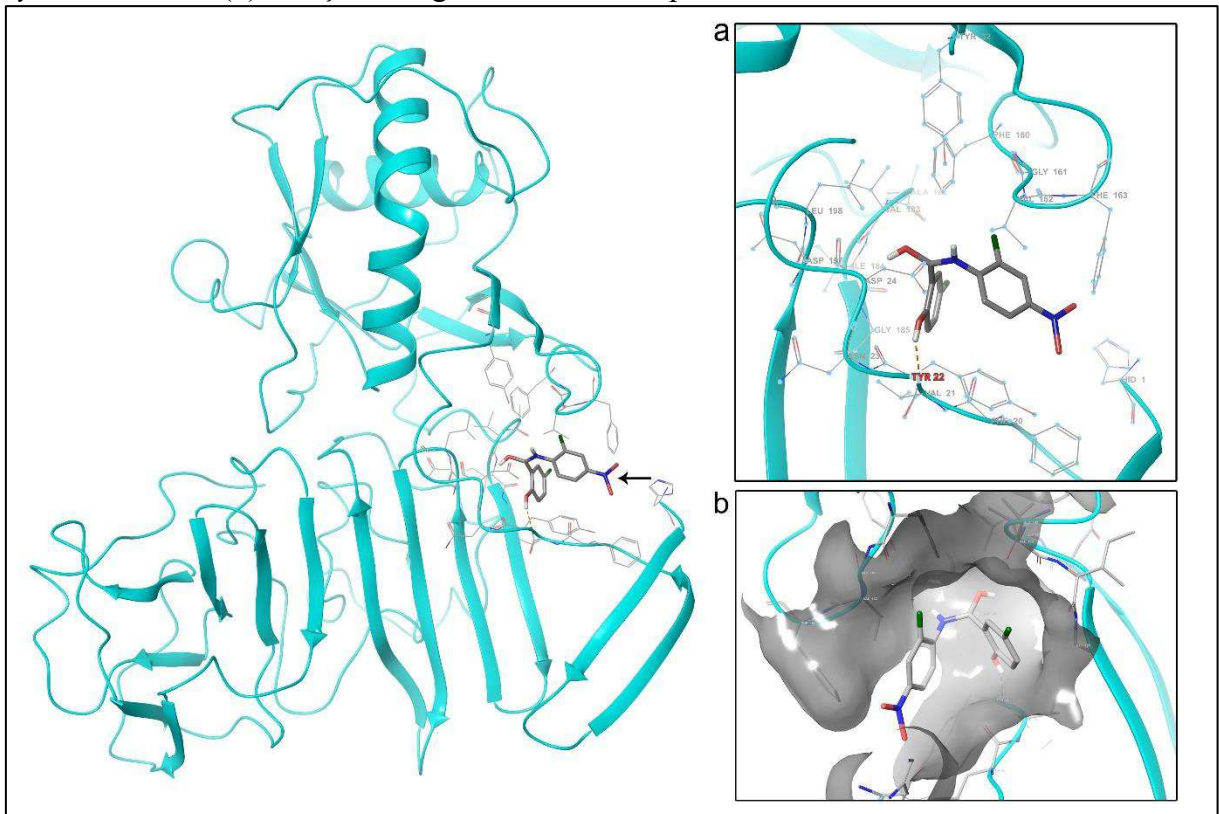
Após a seleção dos complexos (proteína-ligante) de menor energia resultantes do *docking* molecular, as interações a nível intermolecular dessas estruturas foram analisadas, utilizando o programa *Maestro* 11.0. Por meio desse programa foram realizadas análises tridimensionais das interações formadas entre os ligantes e os sítios de ligação das proteínas e para uma análise mais completa, seus respectivos diagramas de interação foram gerados. Todas as figuras nessa sessão foram geradas com o *Maestro*.

#### 4.5.1.1 Análise dos complexos do Cristal 5GS6 da proteína NS1 resultantes do docking

Os modos de ligação seleccionados para o cristal 5GS6 da proteína NS1 foram os primeiros a ser analisados. Na Figura 23, a estrutura 3D do complexo de menor energia ( $-6.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) formado pelo cristal e a Niclosamida (indicada pela seta) exibe a forma e a posição que o ligante assume ao se ligar à molécula proteica e suas respectivas interações com os resíduos de aminoácidos do cristal.

No sítio de ligação da proteína, constatou-se a interação entre a molécula de Niclosamida e o resíduo de *Tyr22* que pode ser observada mais detalhadamente na Figura 23a. A interação intermolecular é representada pela linha tracejada em amarelo, indicando que a distância entre os pares de átomos é de 1Å a 2Å. Em adição, a Figura 23b nos permite observar a posição que o ligante ocupa dentro da cavidade do cristal.

Figura 23 – Interação 3D do ligante Niclosamida com o cristal 5GS6 da proteína NS1 predito pelo *docking* molecular. (a) Imagem ampliada mostrando a interação entre o ligante e o resíduo *Tyr22* do cristal. (b) Posição do ligante na cavidade proteica.

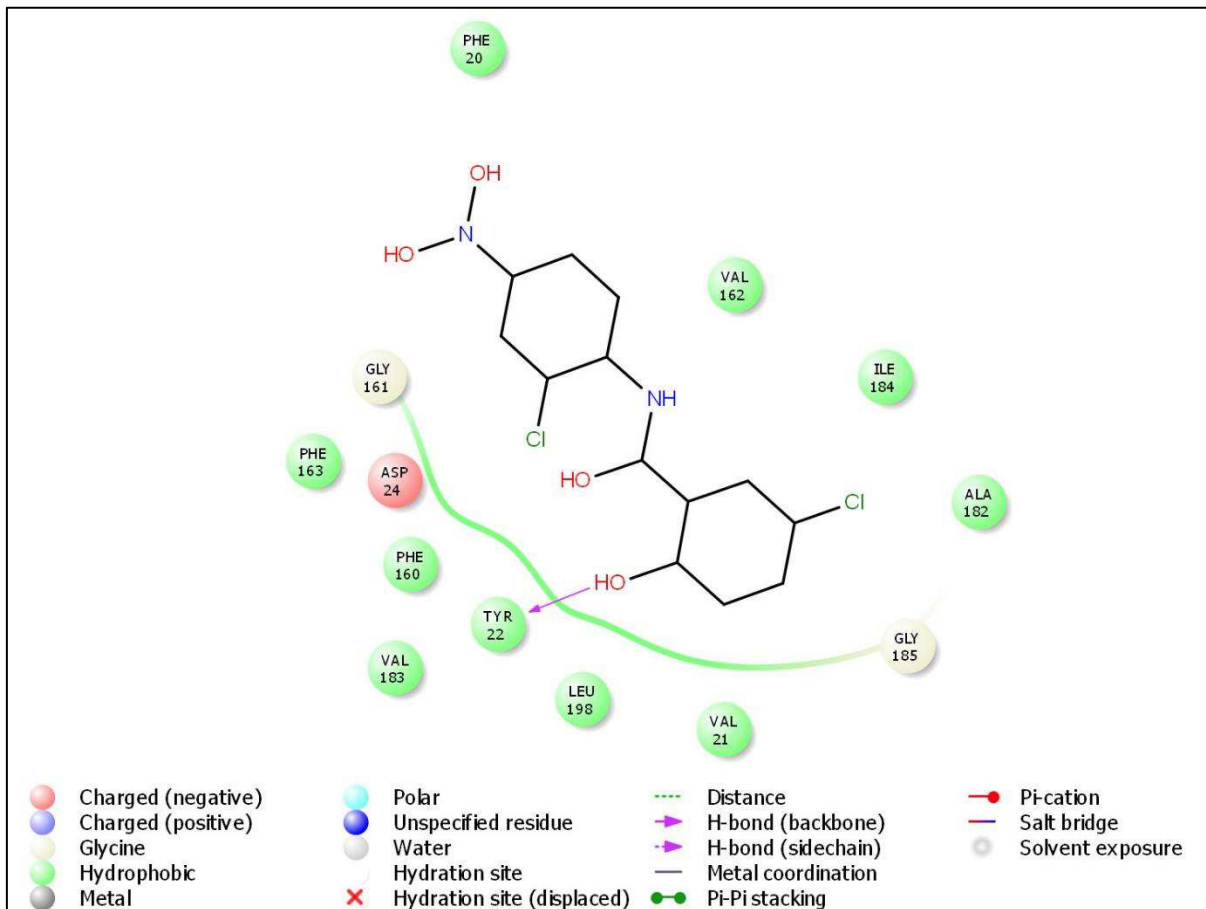


Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Ao analisar os outros modos de ligação de maior energia preditos pelo *docking*, ou seja, os complexos não selecionados, constatou-se que as formas assumidas por essas moléculas eram muito semelhantes umas às outras e que estavam localizadas em regiões espaciais próximas.

Em seguida, o diagrama 2D da interação proteína-ligante foi gerado (Figura 24), confirmando a formação da ligação de hidrogênio entre a cadeia principal do resíduo de *Tyr22* do cristal da proteína e grupo hidroxila do ligante. A tirosina é classificada como um aminoácido polar neutro, por isso apresenta cadeias laterais polares eletricamente neutras em pH neutro. Além disso, é importante ressaltar que a cavidade onde o ligante se localiza na proteína apresenta, predominantemente, resíduos de natureza hidrofóbica, como: *Val 21*, *Val 183*, *Phe 160*, *Phe 163*, *Leu 198* e o próprio resíduo de *Tyr 22*.

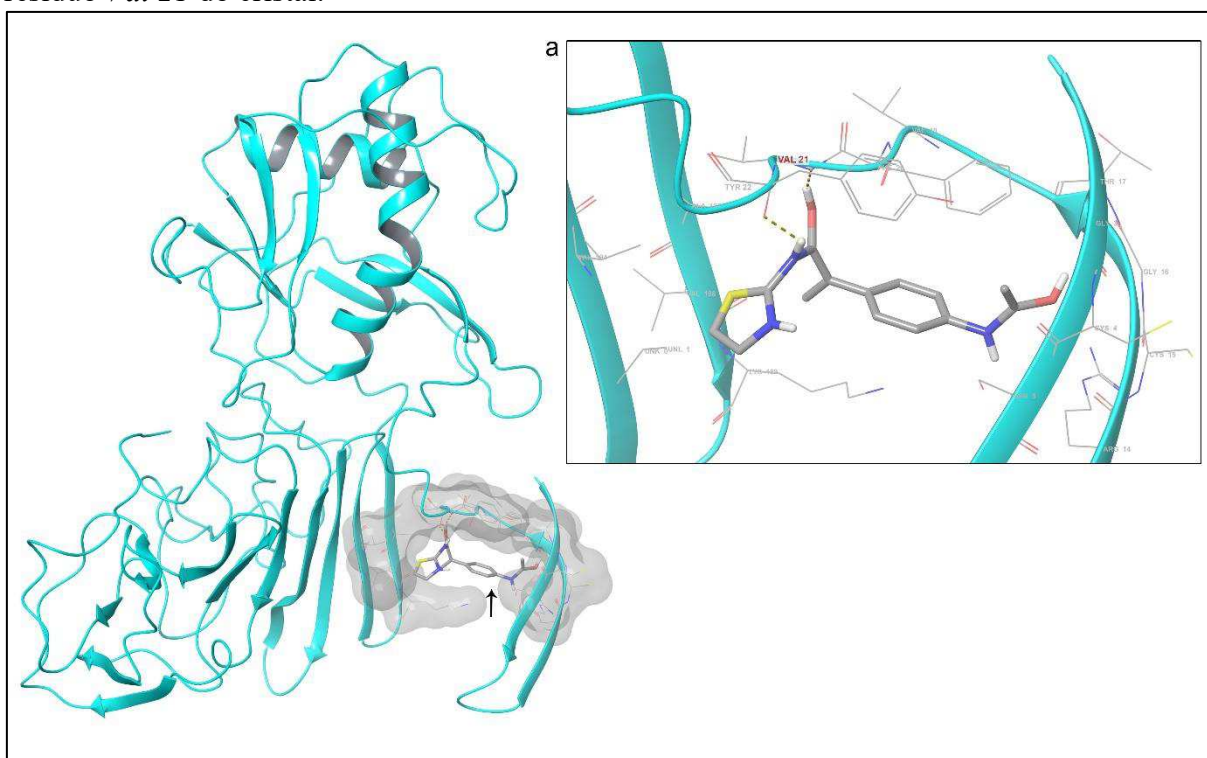
Figura 24 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de Niclosamida e a cavidade do cristal 5GS6 da proteína NS1. A ligação de hidrogênio entre a molécula de Niclosamida, representada pela estrutura 2D, e o resíduo de *Tyr 22* é indicada pela seta.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Para o *docking* do cristal 5GS6 da proteína NS1 com o ligante PHA-690509, e sua respectiva conformação de menor energia ( $-7.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), a análise 3D do complexo nos permitiu observar como o ligante se comporta na cavidade do cristal (Figura 25), além de constatar sua interação com o resíduo de *Val 21* da proteína (Figura 25a). A distância entre os pares de átomos do resíduo de aminoácido e o ligante que interagem é de  $1 \text{ \AA}$  a  $2 \text{ \AA}$ , representada pela linha tracejada de cor amarela. A valina apresenta cadeia lateral apolar sendo classificada, portanto, como um aminoácido apolar.

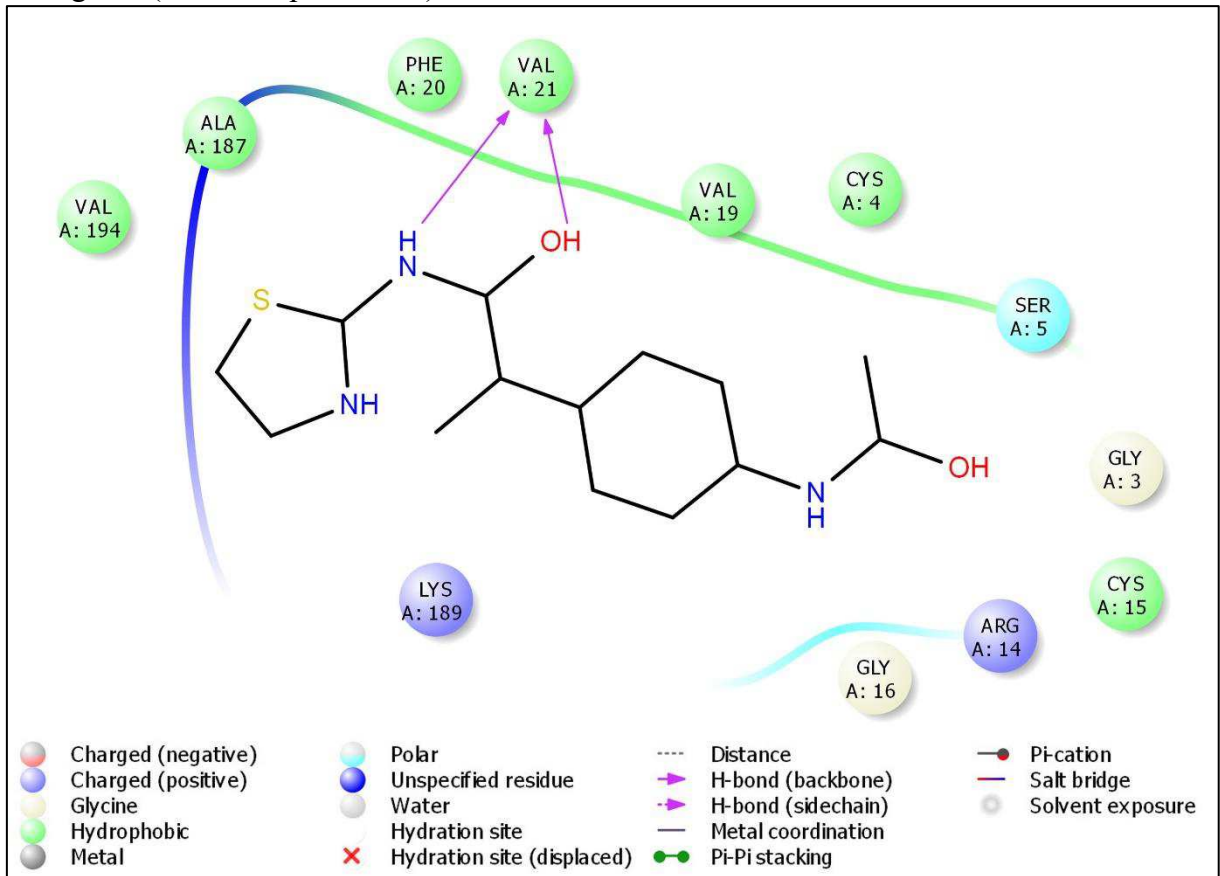
Figura 25 – Interação 3D do ligante PHA-690509 com o cristal 5GS6 da proteína NS1 predito pelo *docking* molecular. (a) Imagem ampliada mostrando as interações entre o ligante e o resíduo *Val 21* do cristal.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Observou-se também que a cavidade da proteína interage com duas porções do ligante que foram melhor visualizadas quando o diagrama 2D de interação proteína-ligante foi gerado (Figura 26). O grupo hidroxila e o grupo amina do ligante formam duas ligações de hidrogênio com o resíduo do aminoácido *Val 21* do cristal. As ligações de hidrogênio ocorrem entre as cadeias principais do ligante e da *Val 21*, indicadas pelas setas contínuas. A região em que o ligante interage com a cavidade apresenta, principalmente, resíduos de natureza hidrofóbica como: *Cys 4*, *Val 19*, *Val 194*, *Phe 20*, *Ala 187* e o próprio resíduo de *Val 21*.

Figura 26 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de PHA-690509 e a cavidade do cristal 5GS6 da proteína NS1. O ligante PHA-690509, representado pela estrutura 2D, interage com o grupo amida do resíduo de *Val 21* por meio de duas ligações de hidrogênio (indicadas pelas setas).



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Após as análises individuais, os resultados do *docking* molecular gerados para cristal 5GS6 (proteína NS1) com seus respectivos ligantes (Niclosamida e PHA-690509) foram comparados. Notou-se que as cavidades onde ambos os ligantes interagem com a proteína, no modo de ligação escolhido, apresentam resíduos de aminoácidos em comum, indicando que estes, em sua conformação de menor energia, se ligam em regiões próximas no sítio de ligação da proteína, o que sugere a potencialidade dessa região como alvo drogável.

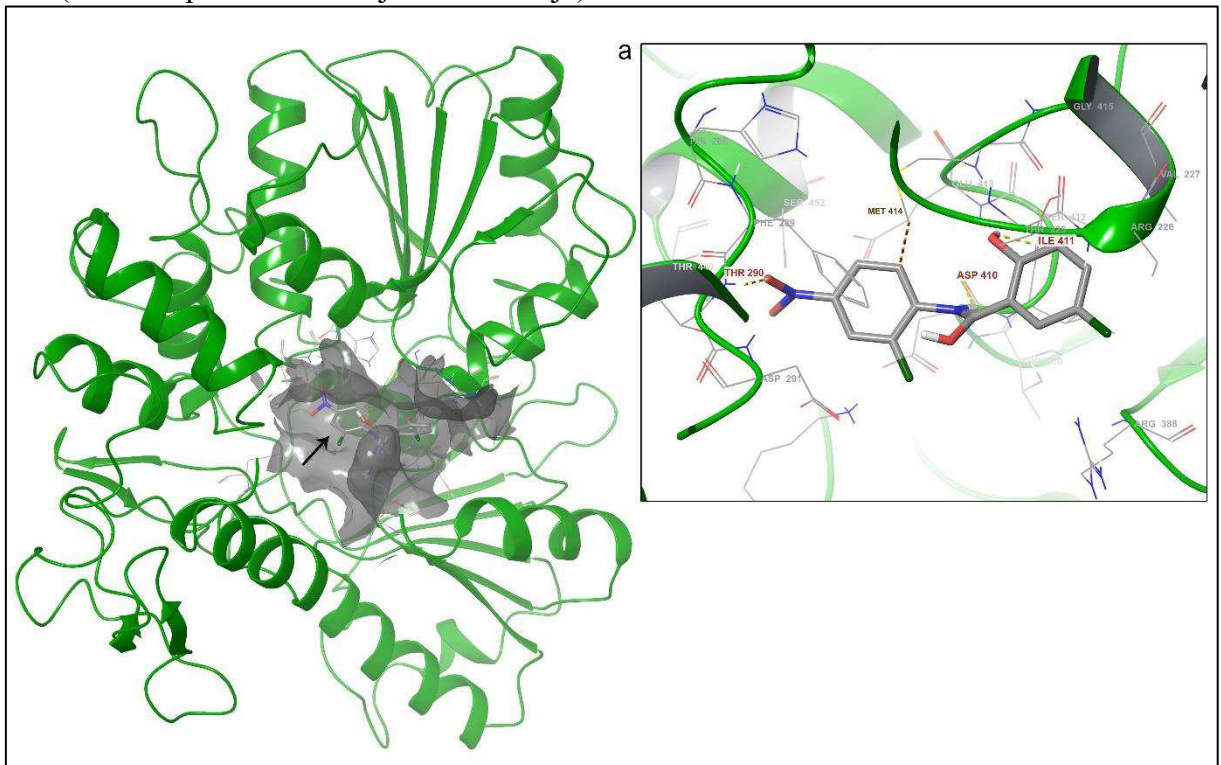
Em relação aos ligantes, ambas as moléculas interagiram com um único resíduo de aminoácido na cavidade da proteína. No entanto, duas ligações de hidrogênio foram formadas na molécula de PHA-690509, enquanto que para a molécula de Niclosamida apenas uma ligação foi formada. Mesmo com uma diferença muito pequena, o ligante PHA-690509 apresenta-se, portanto, mais estável.

#### 4.5.1.2 Análise dos complexos do Cristal 5GJB da proteína NS3 resultantes do docking

A análise do complexo de menor energia resultante do *docking* molecular entre o Cristal 5GJB da proteína NS3 e o ligante Niclosamida foi realizada, como visto na Figura 27. A molécula de Niclosamida, indicada pela seta, interage com os aminoácidos na região central da cavidade do cristal, assumindo forma e posição favorável para se manter no complexo com menor energia ( $-7.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ).

Foram observados um total de quatro interações entre a molécula de Niclosamida e os resíduos de *Thr 290*, *Asp 410*, *Ile 411* (indicadas por setas tracejadas em amarelo), e *Met 414* (indicadas por setas tracejadas em laranja) no cristal da proteína NS3, como visto na Figura 27a

Figura 27 – Interação 3D do ligante Niclosamida com o cristal 5GJB da proteína NS3 predito pelo *docking* molecular. (a) Imagem ampliada mostrando as interações entre a molécula do ligante e os resíduos *Thr 290*, *Asp 410*, *Ile 411* (indicada pela linha tracejada em amarelo) e *Met 414* (indicada pela linha tracejada em laranja) no cristal.

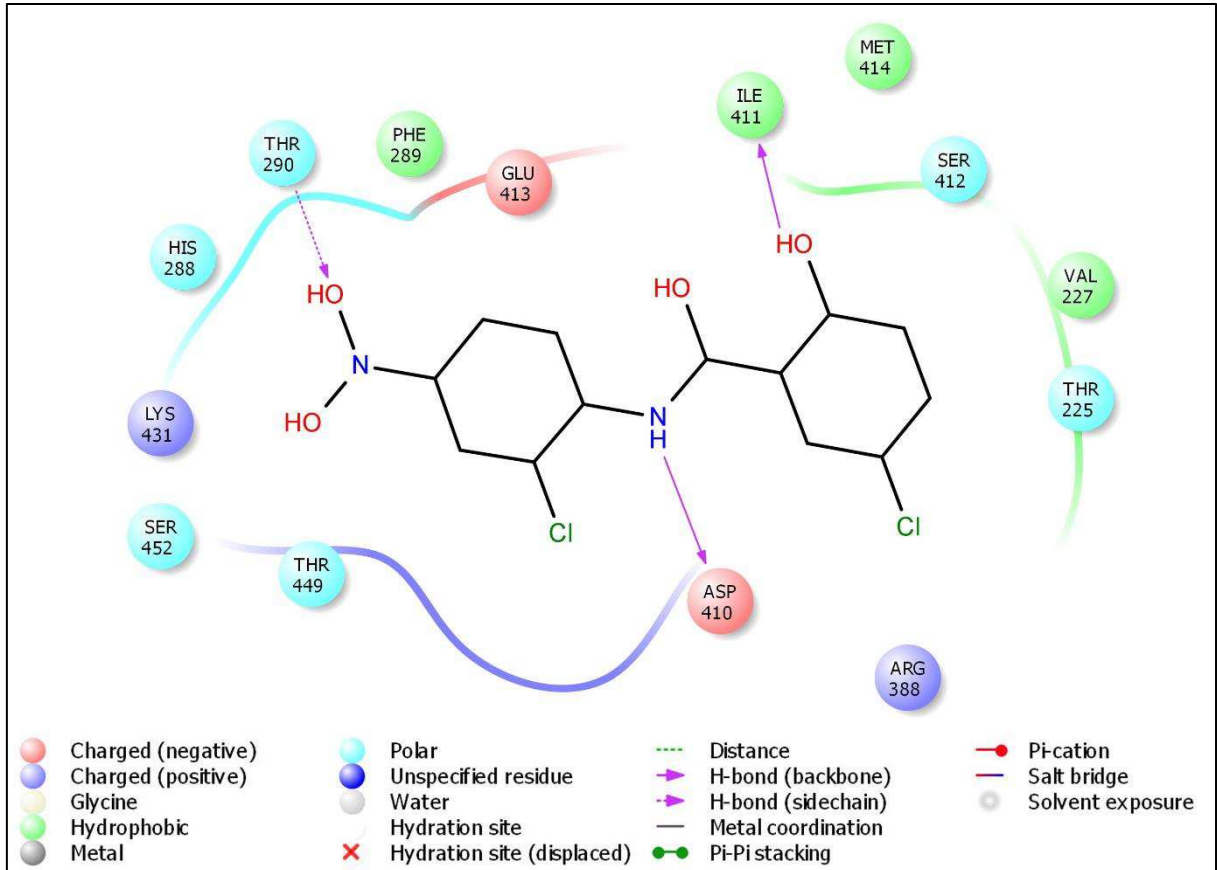


Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Em seguida, o diagrama de interação do complexo proteína-ligante foi gerado para que as ligações entre as moléculas pudessem ser melhor visualizadas. Como visto na Figura 28, três ligações de hidrogênio são formadas entre os resíduos de aminoácidos da proteína e diferentes porções do ligante. O grupo hidroxila do ligante se liga à cadeia lateral do resíduo de

*Thr 290* (indicado pela seta tracejada); O grupo amina do ligante se liga a cadeia principal da *Asp 410* (seta contínua); e o grupo hidroxila do ligante se liga a cadeia principal da *Ile 411* (seta contínua).

Figura 28 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de Niclosamida e a cavidade do cristal 5GJB da proteína NS3. A molécula de Niclosamida, representada pela estrutura 2D, interage com os resíduos *Thr 290*, *Asp 410* e *Ile 411* por meio de ligações de hidrogênio (indicadas pelas setas).



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

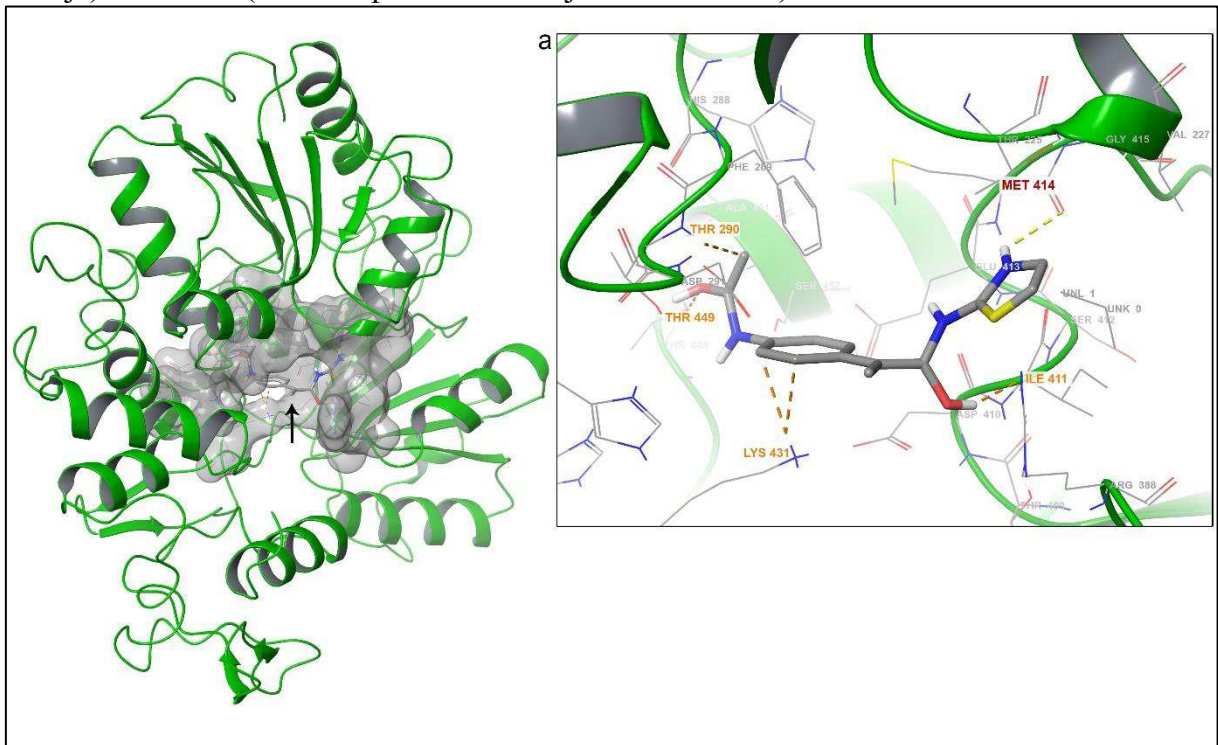
No entanto, observou-se que o resíduo de *Met 414* mesmo estando presente no diagrama de interação, não forma nenhuma ligação com a molécula de Niclosamida. Isso acontece devido à distância entre os pares de átomos dessa interação, que é de 2.0 Å a 3.0 Å, indicada pela linha tracejada de cor laranja, que pode ser observada na Figura 27. Essa distância dificulta, portanto, a formação das ligações de hidrogênio, enquanto que na interação dos outros resíduos com o ligante, indicada pela linha de cor amarela, essa distância é menor (1.0 Å a 2.0 Å) e favorece a formação das ligações de hidrogênio.

Observou-se também que cada um dos resíduos de aminoácidos apresenta uma natureza diferente: *Thr 290* é polar, *Asp 410* é carregada negativamente e a *Ile 411* é de natureza hidrofóbica.

Posteriormente, foi realizada a análise para o complexo de menor energia proveniente do *docking* molecular do cristal 5GJB com o ligante PHA-690509. A forma de menor energia ( $-7.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) que o ligante (indicado pela seta) assume no complexo, bem como sua interação com a cavidade do cristal podem ser observada na Figura 29.

As interações entre a molécula de PHA-690509 e os aminoácidos da cavidade proteica são indicadas por linhas tracejadas em amarelo (1.0 Å a 2.0 Å) e laranja (2.0 Å a 3.0 Å), como visto na Figura 29a. No total, foram identificados cinco resíduos de aminoácidos interagindo com o ligante, estando quatro deles mais distantes (*interações indicadas pela linha laranja*): *Thr 290*, *Thr 449*, *Ile 411* e *Lys 431* e, apenas um resíduo interagindo a uma distância menor (*indicada pela linha amarela*) do ligante: *Met 414*.

Figura 29 – Interação 3D do ligante PHA-690509 com o cristal 5GJB da proteína NS3 predito pelo *docking* molecular. (a) Imagem ampliada mostrando as interações entre a molécula do ligante e os resíduos *Thr 290*, *Thr 449*, *Ile 411*, *Lys 431* (indicada pela linha tracejada em laranja) e *Met 414* (indicada pela linha tracejada em amarelo) no cristal.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Por último, o diagrama de interação proteína-ligante foi gerado (Figura 30) e a presença da ligação de hidrogênio entre o grupo carboxila do resíduo de *Met 414* e o grupo amina da molécula do ligante (representado em 2D) foi confirmada na cavidade da proteína.



O Cristal 5GJB apresenta em sua conformação original uma molécula de ssRNA, que foi retirado da molécula para a execução do *docking* molecular. A região em que a molécula de ssRNA se ligava no cristal proteico, no caso a região central, foi ocupada pelos ligantes Niclosamida e PHA-690509 após o *docking* do cristal com os mesmos. Deduz-se assim que uma interação estável de um ligante nessa região da proteína impediria que a molécula de ssRNA se ligasse no sítio ativo da proteína NS3 trazendo implicações severas para o processo de replicação do vírus, podendo ocasionar a morte do mesmo.

Portanto, foi inferido que a molécula de Niclosamida por formar mais ligações com os aminoácidos do cristal nessa cavidade e, conseqüentemente, estar mais estável no complexo, seria um potencial inibidor de proteína a ser explorado.

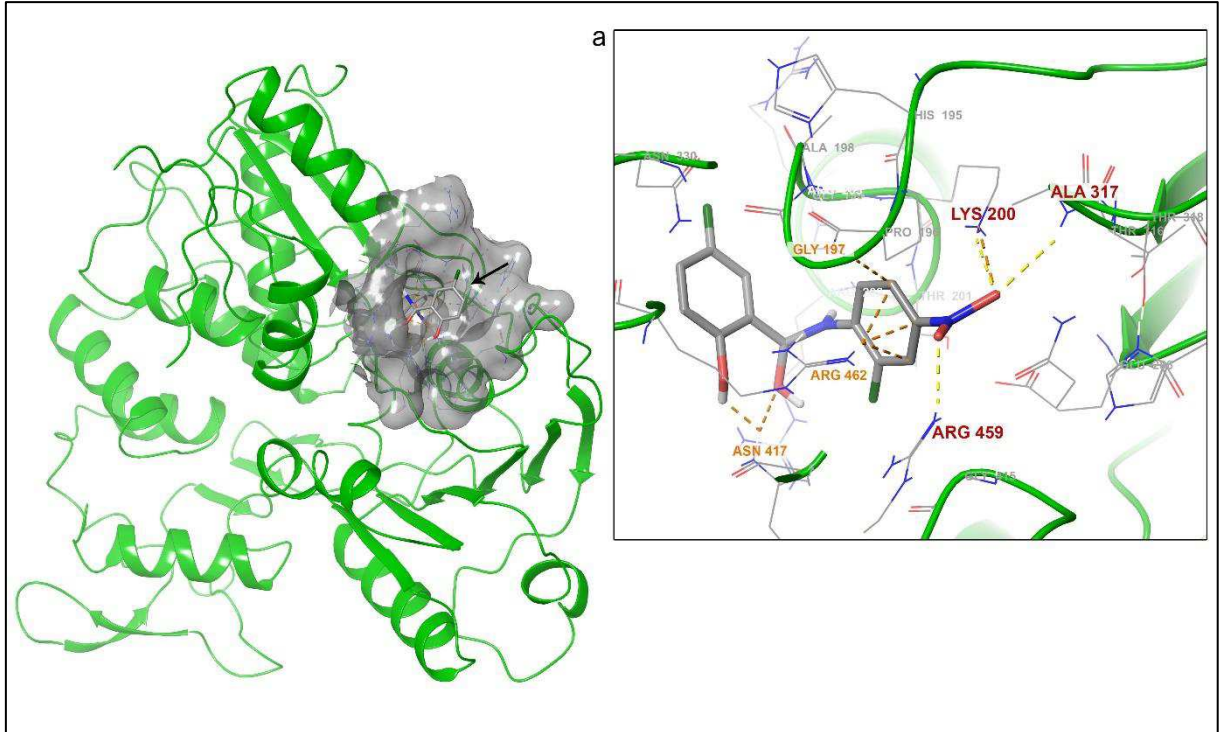
#### ***4.5.1.3 Análise dos complexos do Cristal 5GJC da proteína NS3 resultantes do docking***

Por último, os complexos resultantes do *docking* do cristal 5GJC da proteína NS3 com seus respectivos ligantes foram analisados.

Inicialmente, o complexo de menor energia, formado entre o Cristal 5GJC e o ligante Niclosamida foi analisado. A interação do ligante, indicado pela seta, com os aminoácidos da cavidade da proteína pode ser vista na Figura 31, bem como a conformação assumida pela molécula do ligante para se manter no complexo com menor energia (-7.1 kcal.mol<sup>-1</sup>).

Foram identificados, no total, seis resíduos de aminoácidos na proteína, interagindo com o ligante. Os resíduos de *Lys 200*, *Ala 317* e *Arg 459* interagem com o ligante a uma distância de 1.0 Å a 2.0 Å, indicada pelas linhas tracejadas de cor amarela. Já os resíduos de *Gly 197*, *Asn 417* e *Arg 462* interagem com o ligante a uma distância maior, de 2.0 Å a 3.0 Å, indicados pelas linhas tracejadas de cor laranja. Uma porção do resíduo de *Lys 200* também interage com o ligante a uma distância de 2.0 Å a 3.0 Å (linha tracejada laranja), como visto na Figura 31a.

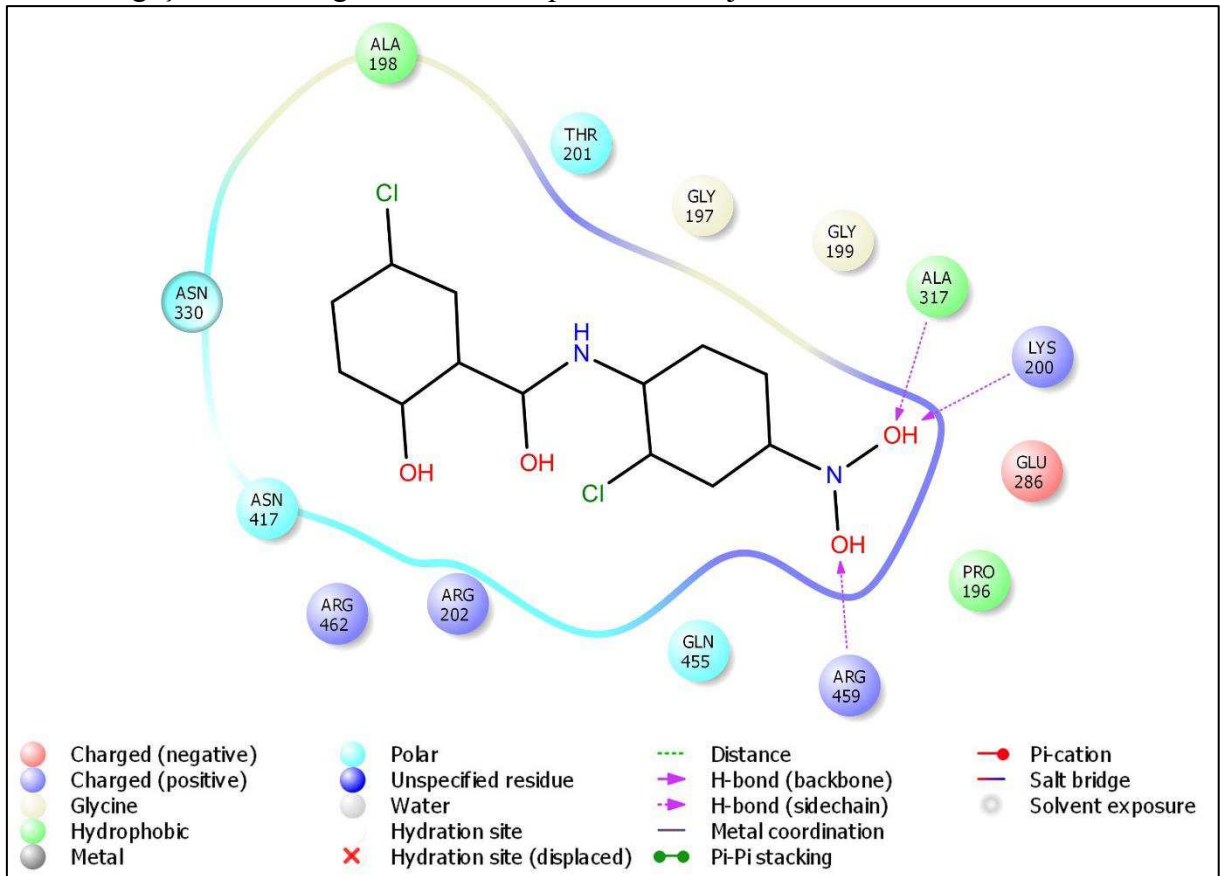
Figura 31 – Interação 3D do ligante Niclosamida com o cristal 5GJC da proteína NS3 predito pelo *docking* molecular. (a) Imagem ampliada mostrando as interações entre a molécula do ligante e os resíduos *Lys 200*, *Ala 317*, *Arg 459* (indicada pela linha tracejada em amarelo), *Gly 197*, *Asn 417* e *Arg 462* (indicada pela linha tracejada em amarelo) no cristal.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Em seguida, o diagrama de interação proteína-ligante foi gerado (Figura 32) e as ligações de hidrogênio entre a molécula de Niclosamida (representada em 2D) e os resíduos de *Lys 200*, *Ala 317* e *Arg 459* foram confirmadas. As interações ocorrem com a cadeia lateral dos aminoácidos (indicadas pelas linhas tracejadas em roxo) e os grupos hidroxila do ligante. Os resíduos de *Gly 197*, *Asn 417* e *Arg 462* também presentes no diagrama, interagem com o ligante, mas não formam ligações de hidrogênio devido à distância (2.0 Å a 3.0 Å) entre os seus pares de átomos.

Figura 32 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de Niclosamida e a cavidade do cristal 5GJC da proteína NS3. A molécula do ligante, representada pela estrutura 2D, interage com a cadeia lateral dos resíduos de *Lys 200*, *Ala 317*, *Arg 459* por meio de ligações de hidrogênio, indicadas pela seta tracejada.

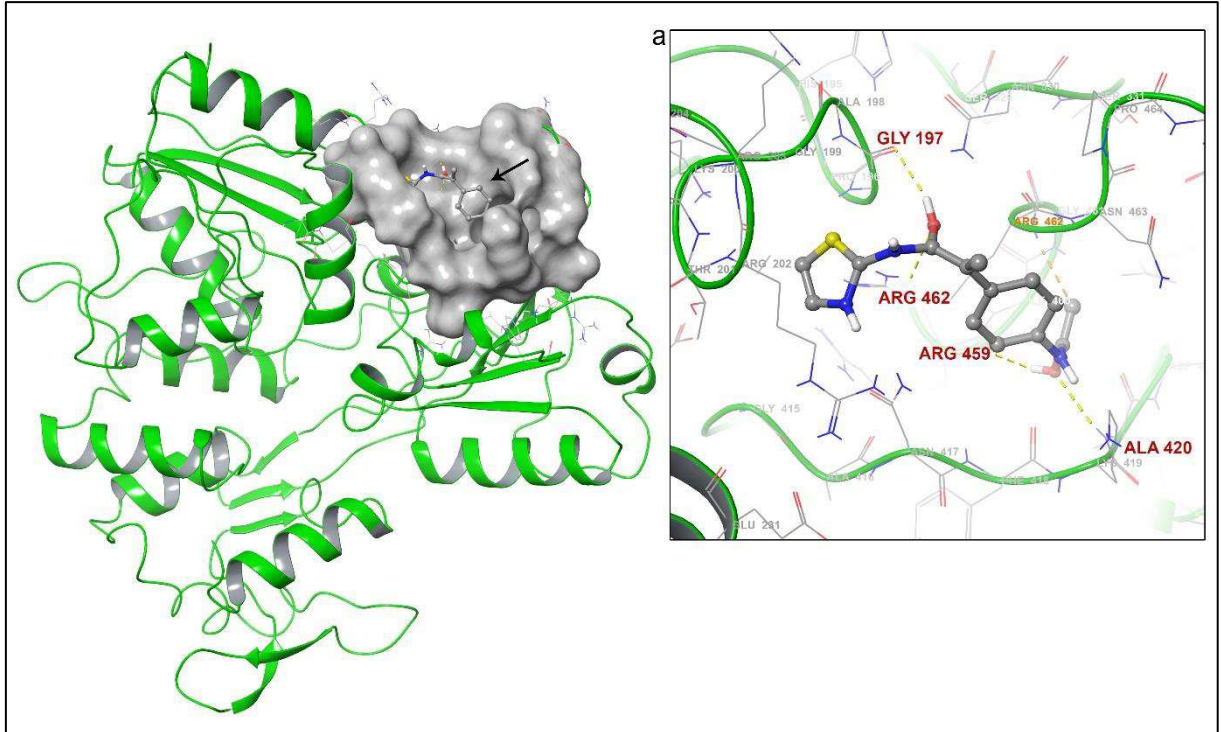


Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

O último complexo a ser analisado, foi resultante do *docking* molecular entre o Cristal 5GJC (proteína NS3) e o ligante PHA-690509. A conformação de menor energia ( $-7.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) assumida pelo ligante para se manter na cavidade da proteína pode ser observada na Figura 33.

No total, foram identificados quatro resíduos de aminoácidos na proteína, interagindo com o ligante. Os resíduos de *Gly 197*, *Ala 420*, *Arg 459* e *Arg 462* interagem com o ligante a uma distância de  $1.0 \text{ \AA}$  a  $2.0 \text{ \AA}$ , indicada pelas linhas tracejadas de cor amarela. Outra região do resíduo de *Arg 462* também interage com o ligante a uma distância maior, de  $2.0 \text{ \AA}$  a  $3.0 \text{ \AA}$  (indicada pela linha tracejada laranja), como visto na Figura 33a.

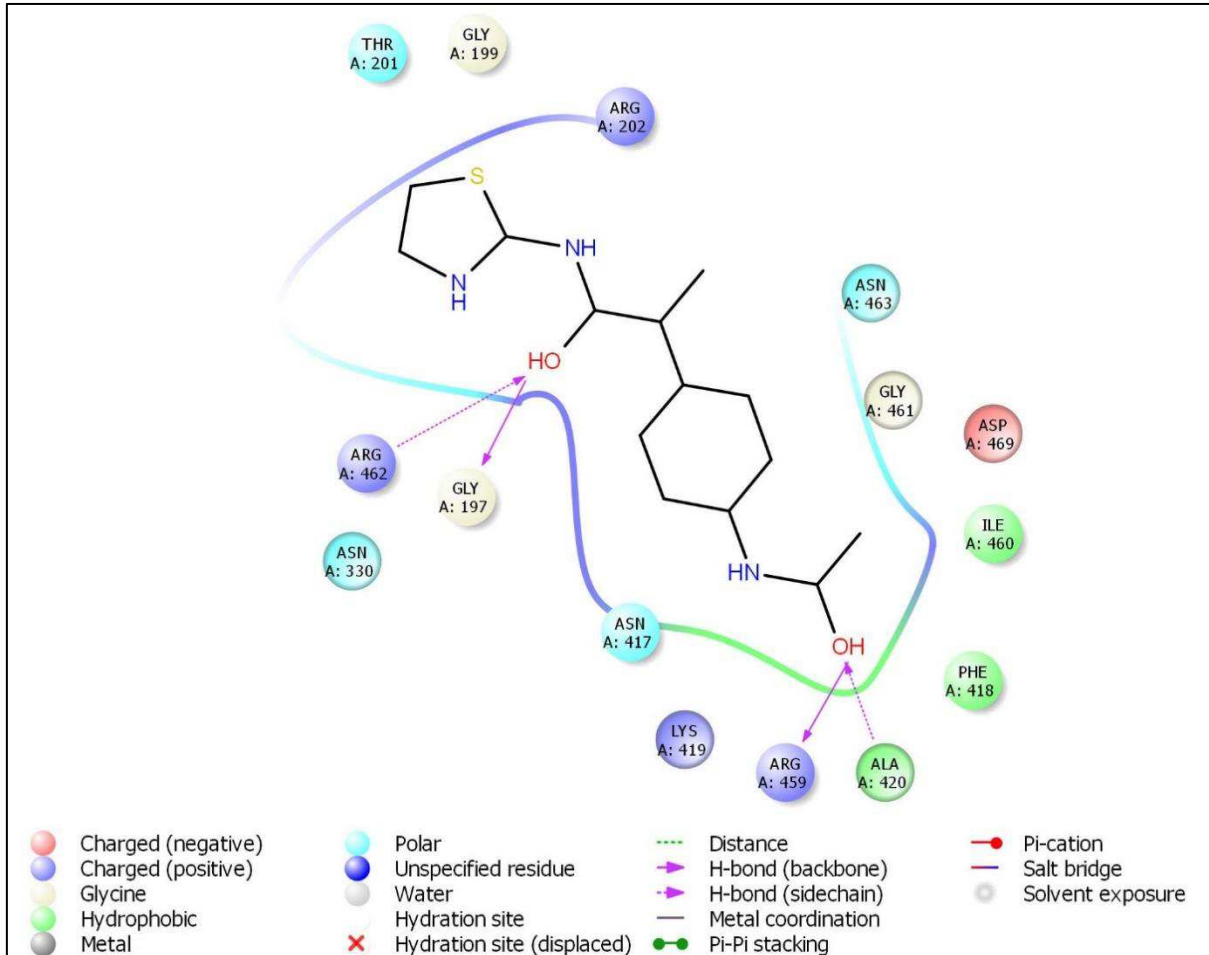
Figura 33 – Interação 3D do ligante PHA-690509 com o cristal 5GJC da proteína NS3 predito pelo *docking* molecular. (a) Imagem ampliada mostrando as interações entre a molécula do ligante e os resíduos de *Gly 197*, *Ala 420*, *Arg 459* e *Arg 462* (indicadas pelas linhas tracejadas em amarelo) no cristal.



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Gerado o diagrama de interação proteína-ligante (Figura 34), as ligações de hidrogênio entre a molécula de PHA-69050 (representada em 2D) e os resíduos de *Gly 197*, *Ala 420*, *Arg 459* e *Arg 462* foram confirmadas. O ligante interage tanto com a cadeia lateral dos resíduos de *Ala 420* e *Arg 462* (indicada pelas linhas tracejadas em roxo), quanto com cadeia principal dos resíduos de *Gly 197* e *Arg 459* (indicadas pelas linhas contínuas em roxo).

Figura 34 – Diagrama de interação 2D proteína-ligante estabelecido entre a molécula de PHA-690509 e a cavidade do cristal 5GJC da proteína NS3. A molécula do ligante, representada pela estrutura 2D, forma ligações de hidrogênio com a cadeia lateral dos resíduos de *Ala 420* e *Arg 462* (indicadas pelas setas tracejadas) e com a cadeia principal dos resíduos de *Gly 197* e *Arg 459* (indicadas pelas linhas contínuas).



Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

Ao final, os resultados do *docking* molecular gerados para cristal 5GJC (proteína NS3) e seus respectivos ligantes (Niclosamida e PHA-690509) foram comparados e observou-se que a região onde os ligantes interagem com a proteína apresentam resíduos em comum (*Arg 459*, *Arg 462* e *Gly 197*). Portanto, concluiu-se que ambos os ligantes, em sua conformação de menor energia, se ligaram em regiões próximas na cavidade proteica, o que sugere a potencialidade dessa região como alvo drogável.

Em relação aos ligantes no *docking* molecular com o cristal 5GJC, a molécula de Niclosamida apresenta seis interações (*Gly 197*, *Lys 200*, *Ala 317*, *Asn 417*, *Arg 459* e *Arg 462*), sendo que apenas três dessas formam ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos na cavidade da proteína (*Lys 200*, *Ala 317*, *Arg 459*). Para a molécula de PHA-690509 foram constatadas a formação de quatro ligações de hidrogênio (*Gly 197*, *Ala 420*, *Arg 459* e *Arg 462*).

O Cristal 5GJC apresenta em sua conformação original uma molécula de ATP, que foi retirada da proteína para a execução do *docking* molecular. A região em que a molécula de ssRNA se ligava no cristal proteico foi ocupada pelos ligantes Niclosamida e PHA-690509 após o *docking* do cristal com os mesmos.

Os dois ligantes apresentaram um número consideravelmente próximo de ligações com a cavidade da proteína no *docking* molecular. Portanto, ambos os ligantes se apresentam como potenciais inibidores competitivos, devido as suas interações com a proteína, ocupando a cavidade proteica e impedindo a ligação da molécula de ATP no sítio ativo da proteína NS3, de modo a dificultar o processo de replicação viral.

#### 4.6 Considerações finais e perspectivas

Devido à seleção de dois cristais (5GJB e 5GJC) para a proteína NS3 do ZIKV, devemos considerar qual o melhor ligante para a proteína NS3 como um todo, tendo em vista que a distinção entre as análises dos cristais se deteve as diferenças nas posições dos sítios de ligação de uma mesma proteína (NS3).

Para os *dockings* realizados com o cristal 5GJB, o modo de ligação escolhido e analisado para a molécula de Niclosamida, quando comparado ao do PHA-690509, formou mais ligações de hidrogênio com o sítio de ligação da proteína. Para o cristal 5GJC, ambos os ligantes apresentaram um número de ligações de hidrogênio similar, com uma ligação de hidrogênio a mais formada para o ligante PHA-690509. Para os modos de ligação escolhidos para o cristal da proteína NS1 foram constatadas duas ligações de hidrogênio entre o PHA-690509 e o um único resíduo de aminoácido do sitio de ligação da proteína, e para a Niclosamida apenas uma ligação de hidrogênio foi observada.

Ao final, as interações formadas para os modos de ligação das moléculas dos ligantes foram somadas, totalizando em 12 interações para a Niclosamida, sendo 7 formadoras de ligações de hidrogênio e para o PHA-690509, 11 interações foram constatadas, sendo 6 formadores de ligações de hidrogênio.

Fundamentado na literatura, a Niclosamida, quando comparada ao PHA-690509, apresenta vantagens devido a ser um fármaco aprovado pela FDA e não apresentar riscos para o feto, sendo recomendada pela OMS como segura durante a gravidez, o que é considerado um avanço para o tratamento das infecções causadas pelo ZIKV em mulheres grávidas (LI *et al.*, 2014; MALUMBRES, 2014; XU *et al.*, 2016a). Baseando-se, portanto, no referencial teórico e

experimental, a Niclosamida se destacou como potencial molécula farmacológica quando comparada à molécula de PHA-690509.

Desta forma, a utilização da molécula de Niclosamida junto a uma coleção de fragmentos químicos (provenientes de uma biblioteca de fragmentos moleculares), como ponto de partida para o método computacional de desenho *de novo* de fármacos (do inglês: *de novo drug design*) se apresenta como uma alternativa futura para a construção de potenciais inibidores competitivos com alta afinidade e especificidade para as proteínas alvos do ZIKV.

## 5 CONCLUSÃO

A análise dos resultados do *docking* molecular entre os cristais das proteínas NS1 e NS3 do ZIKV e os ligantes Niclosamida e PHA-690509 permitiram-nos observar como essas moléculas interagem com os sítios de ligação das proteínas, bem como as conformações assumidas pelos ligantes quando estão em complexos de menor energia. Constatou-se que a ocupação dos sítios ativos das proteínas virais por moléculas estáveis pode interferir diretamente no ciclo replicativo do vírus, por meio da competição direta da ocupação dessas regiões com moléculas essenciais à replicação viral. Assim, se bem estabelecidas as interações intermoleculares entre proteína e ligante, existe uma grande possibilidade de tornar regiões proteicas em alvos drogáveis e de utilizar um ligante como potencial fármaco. Para o presente trabalho, as moléculas selecionadas como ligantes, em particular a molécula de Niclosamida, devido às interações estabelecidas com as proteínas do ZIKV e por seu uso aprovado pela OMS como seguro em mulheres grávidas, apresenta um perfil que pode ser explorado por meio da metodologia computacional de desenho *de novo* de moléculas com potencial farmacológico, atuando assim como inibidores competitivos no sítio ativo de proteínas alvo do vírus da Zika.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, Jaime Henrique *et al.* The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. **Virus Research**, [s.l.], v. 181, p.53-60, mar. 2014.

ARMSTRONG, Najealicka; HOU, Wangheng; TANG, Qiyi. Biological and historical overview of Zika virus. **World Journal Of Virology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-8, 2017.

BAKER, Nathan A. *et al.* Electrostatics of nanosystems: Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 18, p.10037-10041, 21 ago. 2001.

BERMAN, Helen M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.235-242, 1 jan. 2000.

BOLLATI, Michela *et al.* Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 87, n. 2, p.125-148, ago. 2010.

BOROWSKI, Peter *et al.* NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. **Acta Biochimica Polonica**. [s.l.], p. 597-614. 20 ago. 2002.

BRADY, G.; STOUTEN, P.. Fast Prediction and Visualization of Protein Binding Pockets with PASS. **Journal Of Computer-aided Molecular Design**, [s.l.], v. 14, p.383-481, 2000.

CAO-LORMEAU, Van-mai *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, [s.l.], v. 387, n. 10027, p.1531-1539, abr. 2016.

CAO, Xiaocong *et al.* Molecular mechanism of divalent-metal-induced activation of NS3 helicase and insights into Zika virus inhibitor design. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 44, n. 21, p.10505-10514, 19 out. 2016.

- CAPRA, John A. et al. Predicting Protein Ligand Binding Sites by Combining Evolutionary Sequence Conservation and 3D Structure. **Plos Computational Biology**, [s.l.], v. 5, n. 12. 4 dez. 2009.
- CHAN, Jasper F.W. *et al.* Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **Journal Of Infection**, [s.l.], v. 72, n. 5, p.507-524, maio 2016.
- DICK, G.W.A; KITCHEN, S.F; HADDOW, A.J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.509-520, set. 1952.
- DUFFY, Mark R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 360, n. 24, p.2536-2543, 11 jun. 2009.
- EDELING, M. A.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H.. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 111, n. 11, p.4285-4290, 4 mar. 2014.
- EKINS, Sean *et al.* Open drug discovery for the Zika virus. **F1000research**, [s.l.], v. 5, p.150, 9 fev. 2016a.
- EKINS, Sean *et al.* Illustrating and homology modeling the proteins of the Zika virus. **F1000research**, [s.l.], v. 5, p.275, 1 set. 2016b.
- GUILLOUX, Vincent Le; SCHMIDTKE, Peter; TUFFERY, Pierre. Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.168, 2009.
- HUANG, Bingding. MetaPocket: A Meta Approach to Improve Protein Ligand Binding Site Prediction. **Omics: A Journal of Integrative Biology**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.325-330, ago. 2009.

HUANG, Bingding; SCHROEDER, Michael. LIGSITE<sup>csc</sup> : predicting ligand binding sites using the Connolly surface and degree of conservation. **Bmc Structural Biology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.19, 24 set. 2006.

JAIN, Rinku *et al.* Structure of the NS3 helicase from Zika virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 23, n. 8, p.752-754, 11 jul. 2016.

KAWABATA, Takeshi. Detection of multiscale pockets on protein surfaces using mathematical morphology. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 78, n. 5, p.1195-1211, 16 out. 2009.

KIM, Sunghwan *et al.* PubChem Substance and Compound databases. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.1202-1213, 22 set. 2015.

KOZAKOV, Dima *et al.* The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.733-755, 9 abr. 2015.

LASKOWSKI, Roman A.. SURFNET: A program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. **Journal Of Molecular Graphics**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.323-330, out. 1995.

LAURIE, A. T. R.; JACKSON, R. M.. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 21, n. 9, p.1908-1916, 8 fev. 2005.

LI, Yonghe *et al.* Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 349, n. 1, p.8-14, jul. 2014.

LI, Meizhi Irene *et al.* Oral Susceptibility of Singapore Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus) to Zika Virus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 6, 28 ago. 2012.

Maestro Schrödinger Release 2017-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.

MALONE, Robert W. *et al.* Zika Virus: Medical Countermeasure Development Challenges. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 10, n. 3, 2 mar. 2016.

MALUMBRES, Marcos. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.122-122, 2014.

MarvinSketch, Version 16.5.2, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

MCCONKEY, Brendan J.; SOBOLEV, Vladimir; EDELMAN, Marvin. The performance of current methods in ligand–protein docking. **Current Science**. [s.l.], v. 83, n. 7, p. 845-856. 10 out. 2002.

MENG, Xuan-Yu *et al.* Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current computer-aided drug design**, [s.l.], v.7, n. 2, p.146–157, 2011.

MOGHADAM, Saeed Reza Jamali *et al.* Zika virus: A review of literature. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v. 6, n. 12, p.989-994, dez. 2016.

MUMTAZ, Noreen *et al.* Zika Virus: Where Is the Treatment?. **Current Treatment Options In Infectious Diseases**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.208-211, 8 jul. 2016.

National Center for Advancing Translational Sciences. 2017. **What is drug repurposing?** Disponível em: <<https://ncats.nih.gov/preclinical/repurpose>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=4477. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4477>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=121596046. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/121596046>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

NICASTRI, Emanuele *et al.* Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 21, n. 32, 11 ago. 2016.

PAZ, Shlomit; SEMENZA, Jan C. El Niño and climate change—contributing factors in the dispersal of Zika virus in the Americas? **The Lancet**, [s.l.], v. 387, n. 10020, p.745, fev. 2016.

PETERSEN, Emily E. *et al.* Interim Guidelines for Pregnant Women During a Zika Virus Outbreak — United States, 2016. **Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.30-33, 22 jan. 2016.

RAWAL, Gautam; YADAV, Sankalp; KUMAR, Raj. Zika virus: An overview. **Journal Of Family Medicine And Primary Care**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.523-527, 2016.

SHAN, Chao *et al.* Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine. **Acs Infectious Diseases**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.170-172, 11 mar. 2016. American Chemical Society (ACS).

SONG, Hao *et al.* Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.456-458, 18 abr. 2016.

SOUZA, Bruno S. F. *et al.* Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, dez. 2016.

TAY, Moon Y. F. *et al.* The C-terminal 50 Amino Acid Residues of Dengue NS3 Protein Are Important for NS3-NS5 Interaction and Viral Replication. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 290, n. 4, p.2379-2394, 8 dez. 2014.

The Pymol Molecular Graphics, Version 1.8.6.0, Schrödinger, LLC.

TIAN, Hongliang *et al.* Structural basis of Zika virus helicase in recognizing its substrates. **Protein & Cell**, [s.l.], v. 7, n. 8, p.562-570, 18 jul. 2016.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J.. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal Of Computational Chemistry**, [s.l.], 2010.

ViralZone, Zika virus (strain Mr 766). Disponível em:  
<[http://viralzone.expasy.org/6756?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species)>. Acesso em: 16 mar. 2017.

WANG, Anyou *et al.* Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes & Infections**, [s.l.], v. 6, n. 3, 22 mar. 2017.

XU, Miao *et al.* Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1101-1107, 29 ago. 2016a.

XU, Xiaoying *et al.* Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. **The Embo Journal**, [s.l.], v. 35, n. 20, p.2170-2178, 30 ago. 2016b.

YOUNG, Paul R. *et al.* An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. **Journal of Clinical Microbiology**. [s.l.], v.38, n. 3, p.1053-1057, 2000.

YU, Jian *et al.* Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.46-52, 21 out. 2009.