

Introduction to Bioinformatics

Ernane Rosa Martins
(Organizador)

 **Atena**
Editora
2019



Ernane Rosa Martins
(Organizador)

Introduction to Bioinformatics

Atena Editora
2019

INVESTIGAÇÃO IN SILICO DA EFICÁCIA DE FÁRMACOS ANTIVIRAIS NA INIBIÇÃO DA NS5 DO VÍRUS DA ZIKA

Henriqueta Monalisa Farias

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – Paraíba – henriquetamonalisa@gmail.com

Rafael de Lima Medeiros

Universidade Federal de Campina Grande
Cuité – Paraíba - rafaelufcg@gmail.com

Franklin de Ferreira Farias Nóbrega

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – Paraíba - franklinnobrega@yahoo.com.br

Rafael Trindade Maia

Universidade Federal de Campina Grande
Sumé – Paraíba rafael.rafatrin@gmail.com
Autor para correspondência

RESUMO: A febre Zika tornou-se uma das maiores preocupações na saúde pública mundial e do Brasil, principalmente depois da recente descoberta de sua associação com casos de microcefalia. Até o momento não existe vacina disponível para o ZIKV e o tratamento é sintomático. Em uma recente pesquisa foi elucidada a estrutura tridimensional da ZIKV NS5 RdRp, uma proteína associada à RNA polimerase e importante ativadora do processo de replicação do vírus, com esta informação, veio a possibilidade de tornar esta enzima um alvo de novos fármacos. Neste âmbito, estudos teórico-computacionais são de grande valia para sinalizar possíveis inibidores desta enzima que

funcionem com antivirais, logo, o artigo teve como objetivo a investigação da eficácia de fármacos já descritos na inibição da NS5 RdRp do vírus da Zika. A metodologia seguiu os seguintes passos: Análise da estrutura tridimensional da NS5, bem como seu sítio ativo; busca na literatura e nos bancos de dados de moléculas por possíveis inibidores; simulações de *docking* molecular e investigação de interações nos complexos proteína-ligantes e/ou proteína-proteína gerados. Buscou-se destacar quatro parâmetros considerados mais importantes na avaliação para o melhor complexo de cada *docking*: A Constante de Inibição Estimada (CIE), a Energia Intermolecular Final (EIF) e a Energia Livre de Ligação (ELL) estimada pelo programa. Os fármacos testados foram os antivirais: Acyclovir, Indinavir e Valgacyclovir. A pesquisa obteve êxito quanto o objetivo proposto, tendo sido capaz de identificar valores de interação entre os fármacos testados e a proteína responsável pela replicação viral do ZIKV NS5 RdRp.

PALAVRAS-CHAVE: Saúde Pública, Arbovírus, Docking Molecular.

ABSTRACT: Zika fever has become one of the biggest concerns in world public health and Brazil, especially after the recent discovery of its association with cases of microcephaly. Until now, there is no vaccine available for

ZIKV, and the treatment is symptomatic. In a recent research was solved the three-dimensional structure of ZIKV NS RdRp X-Ray crystallography, a protein associated with RNA polymerase and important activator of the virus replication process, with this information, occurred the possibility of making this enzyme a target for new drugs. In this context, theoretical-computational studies are of great value to indicate possible inhibitors for this enzyme that work as antiviral, so the article aimed to investigate the efficacy of drugs already described in the inhibition of NS5 RdRp of the Zika virus. The methodology adopted the following steps: analysis of the three-dimensional structure of the NS5 and its active site; search by potential inhibitors in the literature and databases of molecules; perform molecular docking simulations and analysis of interactions in protein-ligands and/or protein-protein complexes generated. Four parameters, considered to be important in the evaluation for the best complex of each docking, were used: The estimated inhibition constant (EIC), the Final Intermolecular Energy (FIE) and the Free Binding Energy (FBE) estimated by the program. The drugs tested were the antivirals: Acyclovir, Indinavir and Valgacyclovir. The research was successful in terms of the proposed objective and was able to identify interaction values between the drugs tested and the protein responsible for viral replication of the ZIKV NS5 RdRp.

KEYWORDS: Public health, Arbovirus, Molecular docking.

1 | INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo, doenças relacionadas com vetores transmissores de epidemias ainda preocupam e são responsáveis por um alto número de mortalidade e mobilidade humana. O agravante disto é antecedido por alguns fatores, como: ciclo de vida do mosquito, condições ambientais e sanitárias onde estes se desenvolvem e hospedeiros e/ou reservatórios que são diretamente responsáveis por encabeçar a cadeia de transmissão das doenças (CARVALHO & SOUZA, 2016). Focando no Brasil, infelizmente o país ainda vive uma época de carência em termos de saneamento básico, dez anos após a incisão da lei de saneamento básico (Lei 11.445/2007) tem-se 49,07% da população brasileira sem acesso a coleta de esgoto e 57,3% sem esgoto tratado (G1, 2017), um número considerável e agravante em termos de proliferação de doenças virais.

O Zika Vírus (ZIKV) é um arbovírus transmitido pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, e recentes evidências apontam também o mosquito *Culex quinquesfasciatus* como vetor. Também pode ser transmitida por relações sexuais e transfusão sanguínea, mesmo com parceiros e doadores assintomáticos. Os meios de transmissão saliva, urina ou leite materno ainda não foram confirmados. O primeiro registro desta doença foi em 1947 na Floresta Zika, em Uganda, detectado inicialmente em macacos. Em 1954, na Nigéria, foram registrados os primeiros casos humanos (Zanluca et al., 2015).

A confirmação de transmissão da febre causada pelo Zika vírus surgiu no Brasil em meados de abril de 2015, apresentou-se inicialmente nos estados do Rio Grande

do Norte e da Bahia na região Nordeste do país. A semana Epidemiológica (SE) alertou no mesmo ano sobre a sinalização de 19 unidades da Federação sobre a confirmação laboratorial da doença, porém não foram divulgados dados quantitativos. Já em 2016 a SE divulgou não só as unidades (13) como também os dados quantitativos que se mostraram alarmantes: 35.505 casos da doença na região Sudeste, seguido pelo Nordeste, 30.286 casos e no geral foram 91.387 casos de Zika no Brasil (CARVALHO & SOUZA, 2016).

A epidemia causada pelo ZIKV começa a se propagar entre 3 a 12 dias após a picada e tem como sintoma marcante a febre baixa (entre 37,8° e 38,5°C), que vem acompanhada se sintomas gerais, dores articulares, conjuntivite, erupções cutâneas com coceiras, dor muscular e dor de cabeça. Apesar dos sintomas parecem ser triviais surgiram casos mais severos no Brasil e Polinésia Francesa ligados a microcefalia, uma doença neurológica congênita (síndrome de Guillain-Barré) tem sido catalogada. Dentro desse contexto, com o aumento exponencial de casos surgiu a preocupação dos órgãos públicos em respeito à saúde mundial, além de imprescindibilidade em vigiar síndromes neurológicas em pacientes febris agudos, também, existe a necessidade de mais estudos relacionados ao Vírus da zika e pesquisas voltadas a cessar o culminio de seu efeito sobre a população (ZANLUCA, 2015).

Até o momento não existe vacina disponível para o ZIKV e o tratamento é sintomático, ou seja, não há tratamento específico para a doença, apenas medicamentos para amenizar os sintomas. No entanto, diversos estudos focam em desenvolver vacinas e medicamentos específicos. Em uma recente pesquisa foi elucidada a estrutura tridimensional da ZIKV NS5 RdRp, uma proteína associada à RNA polimerase e importante ativadora do processo de replicação (GODOY, A. et al. 2017).

A estrutura tridimensional de uma proteína alvo, preferivelmente com um ligante para a possível elucidção do seu sitio receptor é o segredo para o desenho de fármacos com base na estrutura, uma vez definida a estrutura do sitio receptor pode ser utilizada para determinar um farmacóforo para a triagem virtual em bibliotecas de compostos e em pesquisas de docking molecular que podem ser usados para aclarar e aperfeiçoar a estrutura dos compostos líderes (Willis, 2002).

Com a elucidção da estrutura da ZIKV NS5 RdRp, proteína associada à replicação viral, surgem possibilidades de tornar esta enzima um alvo de novos fármacos, intentando a busca de inibidores e experimentos *in silico*, como o docking molecular (atracamento), podem ser extremamente úteis para a sinalização de possíveis moléculas com potencial para inibição da proteína NS5, logo, este trabalho teve como objetivo selecionar *in silico* possíveis inibidores da proteína de replicação NS5.

2 | MÉTODOS/METODOLOGIA

2.1 Estrutura da ZIKV NS5 RdRp

As coordenadas atômicas da ZIKV NS5 RdRp foram obtidas no banco de dados *PDB-Protein Data Bank* através do código de acesso 5U04 (Godoy et al. 2017). A estrutura (Figura 1) foi analisada visualmente pelo *software VMD-Visual Molecule Dynamics* (Humphrey et al., 1996).

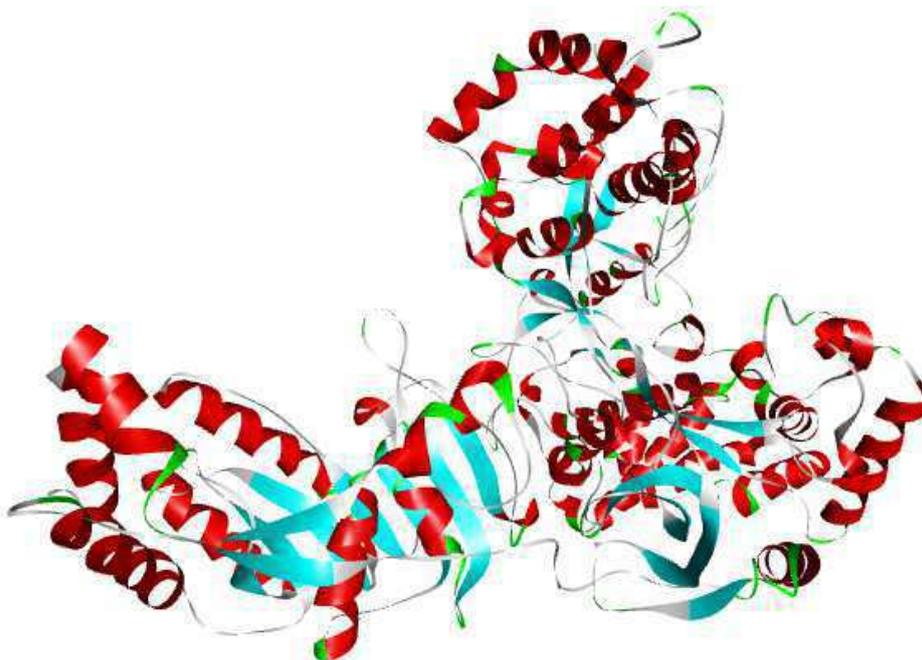


Figura 1 – Visualização do ZIKV NS5 RdRp

Fonte – Autores.

2.2 Seleção Das Moléculas

Foi realizada uma revisão de literatura, com a perspectiva de melhor desenvolvimento de pesquisa e elucidar possível moléculas ligantes que possam vir a mostrar bons resultados computacionais quanto a sua inibição a NS5. A pesquisa se deu nos sites de busca acadêmica Google acadêmico onde foi possível visitar banco de informações como SciELO, PubMed, Lilacs, Medline entre outras plataformas.

Com relação a estrutura dos ligantes foram feitas buscas na literatura e em bancos de dados de pequenas moléculas, como o *ZINC Database*, *Pubchem* e também o banco do *Chempider* (h. Foram gerados arquivos na extensão *.pdb* e as estruturas dools compostos a serem testados forma analisadas visualmente pelo *VMD-Visual Molecule Dynamics* e no *Discovery Studio*.

2.3 Docking molecular

Os experimentos de docking proteína-ligante ZIKV NS5 RdRp +Ligante foram realizados no programa Autodock1.5.6 (Morris et al., 2009), no qual ocorreu um pré-

dimensionamento da grade cúbica de energia de volume 126 x 126 x 126 Å, que foi centrada no receptor. Utilizou-se o algoritmo genético Lamarckiano (LGA). Dez conformações ranqueadas por energias foram geradas para cada complexo proteína-ligante, após organizadas, coletadas fez-se a análise através da opção Autodock tools. As conformações obtidas organizadas, coletadas e analisadas através da opção Autodock tools. Os melhores complexos de cada simulação foram selecionados para análise visual no VMD (Humphrey et al., 1996).

2.4 Compostos Testados

As análises foram feitas a partir de fármacos já conhecidos no mercado pela sua aplicação antiviral, porém nenhum deles possui trabalhos na literatura sobre esta função aplicada diretamente ao Zika vírus.

2.5 Acyclovir

É análogo acíclico da desoxiguanosina. Seu mecanismo de ação está esclarecido. Pela ação catalítica das timidino-quinases dos vírus *Herpes simplex* e *Varicella zoster*, as quais o fármaco se liga 200 vezes mais firmemente que a enzima celular, o aciclovir é convertido ao monofosfato de aciclovir, um nucleotídeo, que é convertido ao difosfato pela guanilato-quinase celular e ao trifosfato pela guanilato-quinase celular e ao trifosfato por várias enzimas celulares. O trifosfato interfere com a DNA polimerase dos vírus citados e inibe a replicação do DNA viral, o que acarreta a morte dos vírus. Esta ação é seletiva; para inibir o crescimento das células do hospedeiro seria necessária concentração 3.000 vezes maior do que a atingida do vírus (Anvisa, 2015). A molécula (Figura 2) pode ser obtida através de <http://zinc.docking.org/substance/1530555>.

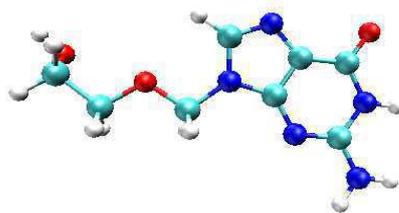


Figura 2 – Visualização do Acyclovir no software VMD-Visual Molecule Dynamics.

Fonte – Autores.

2.6 Valgacyclovir

É um pró-fármaco do ganciclovir (Figura 3) resultante da mistura de dois diastereômeros. Estes são convertidos ao ganciclovir através de esterases hepáticas e intestinais. Sua ação antiviral resulta da inibição da síntese do DNA viral mediada pelo trifosfato de ganciclovir. Comercializado como cloridrato (Anvisa, 2016). A molécula pode ser obtida através de <http://zinc.docking.org/substance/1543916>.

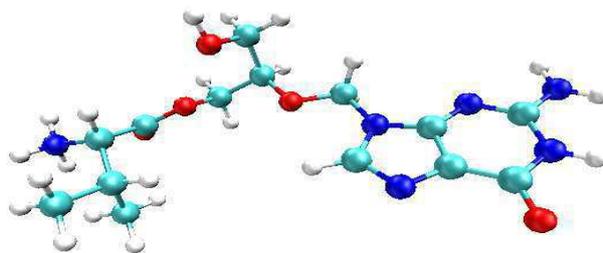


Figura 3 – Visualização do Valganciclovir no software *VMD-Visual Molecule Dynamics*.

Fonte – Autores.

2.7 Indinavir

Pertencente a categoria dos inibidores de protease, ao contrário zidovudina, didanosina, zalcitabina e estavudina, que são inibidores da transcriptase reversa (Anvisa, 2016). O sulfato de indinavir possui a seguinte estrutura química, contendo cinco centros quirais (Figura 4). A molécula pode ser obtida através de <http://zinc.docking.org/substance/22448696>

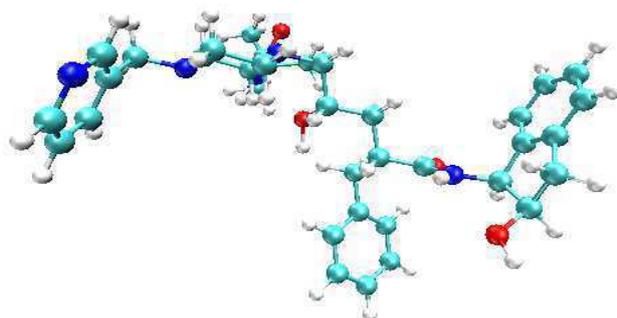


Figura 4 – Visualização da Indinavir no software *VMD-Visual Molecule Dynamics*.

Fonte – Autores.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As energias obtidas nos cálculos de *Docking* foram calculadas a partir de grades localizadas no sítio ativo da proteína, a escolha do algoritmo lamarkiano foi fundamental para que os ligantes buscassem conformações que fossem favoráveis para seu atracamento. No programa Autodock4 a proteína foi previamente considerada rígida em todas as simulações de Docking, enquanto os ligantes flexíveis, ao fim, foram obtidos dez conformações de cada interação proteína-ligante testados neste trabalho. Destacou-se três parâmetros que foram considerados mais importantes para a busca do objetivo proposto, estes foram: A Constante de Inibição Estimada (mM), A Energia intermolecular Final e a Energia livre de ligação (kcal/mol) estimada pelo programa. As tabelas a seguir irão expor o resultado destes parâmetros.

3.1 Acyclovir

Os resultados de *Docking* Molecular do Acyclovir com a NS5 retratam o quanto os parâmetros podem variar de acordo com a conformação/complexo utilizado. A Constante de inibição expressa se mostrou bastante elevada em todos os complexos, variando de 393.06 mM a 997.97mM. Com relação a Energia Livre de Ligação e Energia Intermolecular Final, em praticamente todos os complexos, exceto no complexo 4 (onde o programa não apresentou valores para Ki), as energias foram negativas, evidenciando através do Docking Molecular, que a interação proteína-ligante utiliza menos energia em sua conformação conjunta do que separadas. Na tabela 1, é apresentado os resultados dos cálculos de docking do Acyclovir a partir das estruturas obtidas nesta pesquisa. Na tabela 1, é apresentado os resultados dos cálculos de docking do Acyclovir a partir das estruturas obtidas nesta pesquisa.

Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	Ki
1	-0.07	-1.86	888.17
2	-0.17	-1.96	749.35
3	-0.37	-2.16	535.47
4	+0.13	-1.66	-
5	-0.37	-2.16	539.31
6	-0.35	-2.14	554.31
7	-0.11	-1.90	826.13
8	-0.11	-1.90	833.49
9	-0.01	-1.80	997.97
10	-0.55	-2.34	393.06

Tabela 1 - KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em mM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4.

Fonte – Autores.

Após a realização dos cálculos de docking do Acyclovir, utilizando o programa Discovery Studio, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligações de hidrogênio com os aminoácidos Ser703, Asn704 e Glu707. Como pode-se ver na Figura 5.

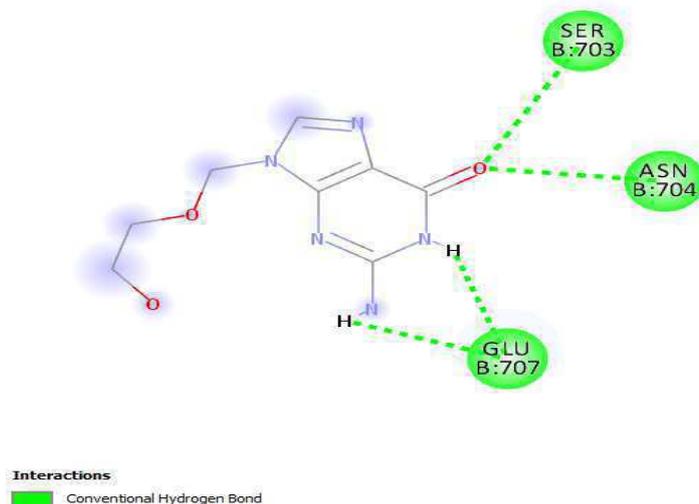


Figura 5 – Visualização 2D do composto Acyclovir e os resíduos da NS5 de maior interação.

Fonte – Autores.

Ainda no uso do software Discovery Studio (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014) foi possível analisar a nuvem eletrostática do receptor (NS5), onde é possível notar que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra. Próximo ao local de encontro, também é possível notar uma região muito eletronegativa, um dos aminoácidos responsáveis é o Glu 707. Essas afirmações podem ser observadas na Figura 6.

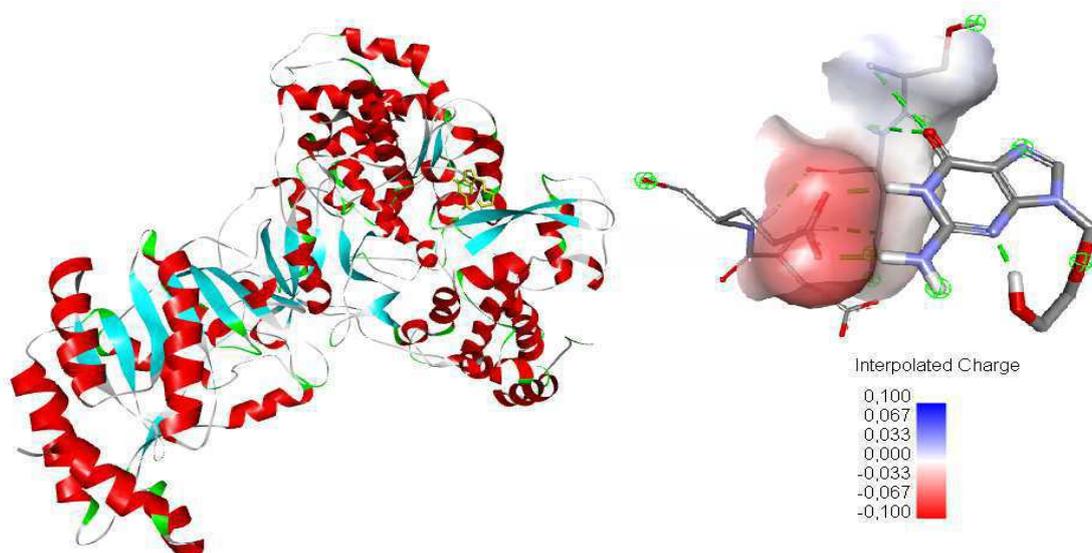


Figura 6 – Proteína NS5 RdRp com fármaco Acyclovir (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação receptor com o acyclovir.

Fonte – Autores.

3.2 Indinavir

O Docking Molecular do fármaco indinavir com a Proteína NS5 RdRp apresentou altas constantes de inibição, variando de 8.13mM a 652.40mM. A Energia Livre de ligação foi negativa em basicamente todos os complexos, exceto o complexo 8. Enquanto a Energia Intermolecular Final apresentou resultados expressivamente

negativos. Logo, os parâmetros evidenciam uma boa interação ligante-proteína entre as moléculas propostas (Tabela 2).

Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	Ki
1	-1.27	-5.45	117.02
2	-0.60	-4.78	362.50
3	-0.25	-4.43	651.89
4	-2.47	-6.65	15.46
5	-1.69	-5.86	57.98
6	-0.98	-5.16	189.90
7	-2.85	-7.03	8.13
8	+2.85	-3.81	-
9	+0.36	-4.43	652.40
10	-0.64	-4.82	336.90

Tabela 2 - KI ou Constante de inibição estimada (CIE) em mM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4.

Fonte – Autores.

Após a realização dos cálculos de docking do Indinavir, utilizando Discovery Studio, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligação de hidrogênio com os aminoácidos Trp702, ligações Pi com Asp534, Thr 700, Cys 849, Val 708, Pro 709. Como pode-se ver na Figura 7.

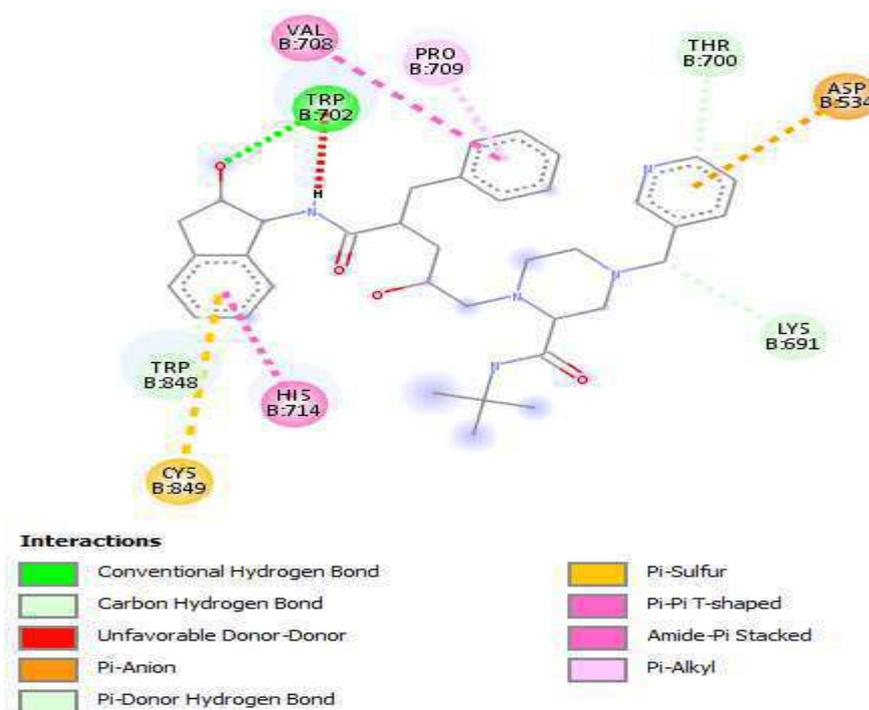


Figura 7 – Visualização 2D do composto Indinavir e os resíduos da NS5 de maior interação.

Fonte – Autores.

Utilizando o Discovery Studio foi possível analisar a nuvem eletrostática do receptor, onde é possível notar que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra. As regiões mais próximas não apresentam picos eletrostáticos.

Essas afirmações podem ser observadas na Figura 8.

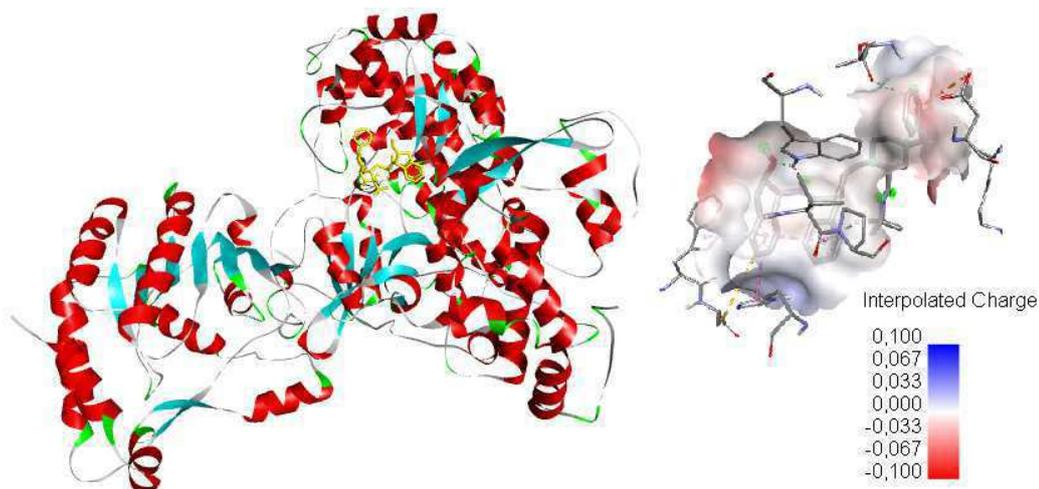


Figura 8 - Proteína NS5 RdRp com fármaco Indinavir (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação receptor com o Indinavir.

Fonte – Autores.

3.3 Valgacyclovir

O Valgacyclovir demonstrou resultados interessantes. Nos oito primeiros complexos o programa não apontou valores para constantes de inibição e nestes mesmos complexos, a Energia Livre de Ligação se mostrou positiva. Entretanto, A Energia Intermolecular Final de todos os complexos se apresentaram negativas, enquanto, as constantes de inibição apontada entre os complexos nove e dez variaram entre 100.23mM a 467.82mM (Tabela 3).

Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	Ki
1	+0.78	-2.80	-
2	+0.85	-2.75	-
3	+0.60	-2.98	-
4	+1.47	-2.11	-
5	+0.99	-2.59	-
6	+0.13	-3.45	-
7	+2.00	-1.58	-
8	+1.99	-1.59	-
9	-1.36	-4.94	100.23
10	-0.45	-4.03	467.82

Tabela 3 – KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em mM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4.

Fonte – Autores.

Após a realização dos cálculos de docking do Valgacyclovir, utilizando Discovery Studio, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligação de hidrogênio com os aminoácidos Ala 533 e Asp 692, Atração eletrostática com Asp 535, Asp 534. Como pode-se ver na Figura 9.

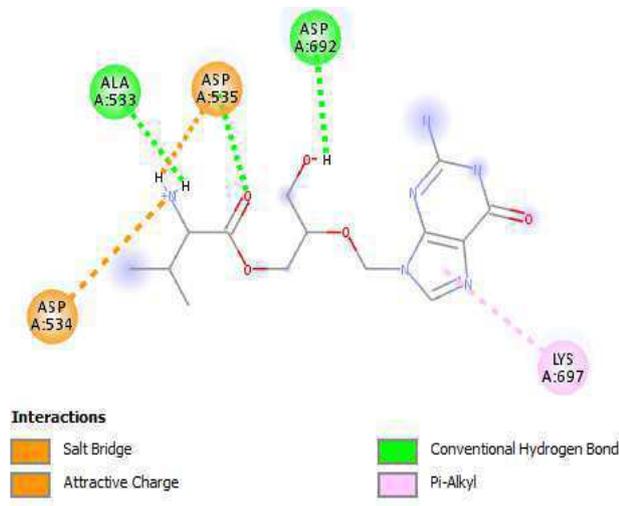


Figura 9– Visualização 2D do composto Valgacyclovir e os resíduos da NS5 de maior interação.

Fonte – Autores.

Utilizando o Discovery Studio foi possível analisar a nuvem eletrostática do receptor, onde é possível notar que o local de atracamento está situado em uma região dentro da nuvem. As regiões mais próximas apresentam picos eletrostáticos. Essas afirmações podem ser observadas na Figura 10.

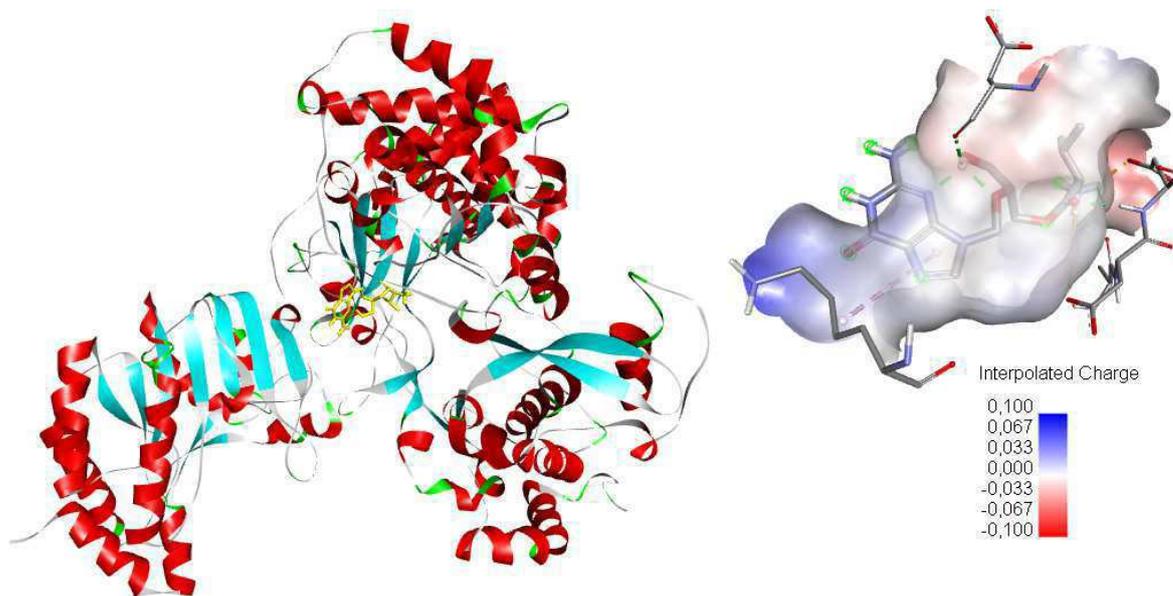


Figura 10 - Proteína NS5 RdRp com fármaco Valgacyclovir (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação receptor com o Valgacyclovir.

Fonte – Autores.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos *in silico* trouxeram consigo ferramentas computacionais altamente eficientes para a resolução de problemas farmacológicos, dentre essas ferramentas, é possível destacar o Docking molecular, que para a realização deste trabalho vem sendo indispensável, por unir conceitos matemáticos físico-químicos, termodinâmicos

e químicos propriamente ditos.

Os três resultados em destaque mostraram uma interação direta com o sítio ativo da proteína por meio de ligações covalentes e pontes de Hidrogênio, além de excelentes constantes de inibição e suas energias (intermolecular final e livre de ligação) apontarem uma alta taxa de negatividade o que indica menor perda de energia na união dessas moléculas. Os três compostos em questão demonstraram evidências na inibição da NS5 RdRp do ZIKV.

REFERÊNCIAS

Anvisa. Pharlab Indústria Farmacêutica. 2015. **Aciclovir**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9641322015&pIdAnexo=2929512. Acesso em: Jun de 2018.

Anvisa. Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. 2016. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=27709202016&pIdAnexo=4202882. Acesso em: Jun de 2018.

BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER. 2014. Disponível em: <http://accelrys.com/products/datasheets/discovery-studio-visualizer.pdf>. Acesso em: jul de 2018.

CARVALHO, C. D. S; SOUZA, Z.H. **Reflexão Acerca Da Incidência Dos Casos De Dengue, Chikungunya E Zika No Brasil**. I Colóquio Estadual De Pesquisa Multidisciplinar, 2016, Unifimes – Centro Universitário De Mineiros – Goiás, 2016.

G1. **Saneamento Melhora, Mas Metade Dos Brasileiros Segue Sem Esgoto No País**. São Paulo, 2017. Disponível. Em: <https://G1.Globo.Com/Economia/Noticia/Saneamento-Melhora-Mas-Metade-Dos-Brasileiros-Segue-Sem-Esgoto-No-Pais.Ghtml> .

GODOY, A. et al. **Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase**. *Nature Communications*. VL - 8, 2017.

HUMPHREY, W. et al. **“VMD - Visual Molecular Dynamics”**. *J. Molec. Graphics*, vol. 14, p. 33-38. 1996.

WILLIS, R.C., (2002), **“Surveying the binding site”**, *Modern Drug Discovery*, September, pages 28-34

ZANLUCA C. et al. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110:569–72, 2015.