

ANA FLÁVIA COSTA DA SILVEIRA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE ANÁLOGOS DA
INDAN-1,3-DIONA CONTRA A PROTEASE DO VÍRUS WEST NILE E
ANTIVIRAL CONTRA OS VÍRUS DENGUE E ZIKA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48a
2017
Oliveira, Ana Flávia Costa da Silveira, 1985-
Avaliação do efeito inibitório de análogos da
indan-1,3-diona contra a protease do vírus West Nile e antiviral
contra os vírus Dengue e Zika / Ana Flávia Costa da Silveira
Oliveira. – Viçosa, MG, 2017.
xi, 83f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.68-83.

1. Agentes antivirais. 2. Arbovírus.
3. Medicamentos-Pesquisa. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.0194

ANA FLÁVIA COSTA DA SILVEIRA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE ANÁLOGOS DA
INDAN-1,3-DIONA CONTRA A PROTEASE DO VÍRUS WEST NILE E
ANTIVIRAL CONTRA OS VÍRUS DENGUE E ZIKA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2017.


Tiago Antônio de Oliveira Mendes


Marcelo Henrique dos Santos


Róbson Ricardo Teixeira


Daniel Henrique Soares Leal


Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Dedico este trabalho à Deus, que
revelou seus atributos invisíveis, seu
eterno poder e sua natureza divina
através das coisas criadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, o Senhor de todas as coisas, que me concede graça e misericórdia, e que a cada dia me surpreende com a perfeição das coisas feitas pelas Suas mãos!

Agradeço ao meu marido e amigo André, te conhecer foi uma das maiores graças da minha vida, não consigo imaginar concluir mais essa etapa sem você. Obrigado por sempre saber transformar minhas lágrimas em sorrisos!

Aos meus dois filhos, o Israel que com seu jeitinho tão especial alegra os nossos dias, que me acompanhou tantas vezes nos experimentos, compreendeu as ausências e me presenteou com muitos sorrisos! O Pedro, que mais uma vez é prova da bondade de Deus nas nossas vidas, todas as vezes que sinto você dentro de mim, meu coração dispara de alegria!

Aos meus pais, que foram fundamentais para alcançar esse objetivo, agradeço por tanto sacrifício e empenho para que eu chegasse até aqui, somente vocês sabem quantas coisas foram deixadas de lado para que essa conquista me fosse concedida!

À minha vó que durante muito tempo segurou a minha mão e me ensinou às primeiras letras, queria muito que estivesse aqui!

Aos meus irmãos, cunhadas, cunhados, sobrinhas, sobrinhos e meu sogro que fazem da família uma dádiva especial. Amo o barulho, as comidas e as risadas quando estamos juntos!

Aos meus amigos e amigas de perto e de longe que sempre apareciam com uma mensagem de apoio, de incentivo e torceram por mim!

Ao meu orientador, professor Sérgio, que me concedeu essa oportunidade sem me conhecer, serei sempre grata! Agradeço pelo incentivo e confiança!

Aos demais professores que tiveram uma participação especial nessa conquista: Róbson, Tiago, Leandro, Rafaela e Daniel, é um prazer enorme aprender com vocês!

Aos meus colegas do laboratório, pelo apoio, expectativa e torcida! Em especial ao André, Edjon e Ítalo, sofremos juntos quando as células contaminavam, as placas soltavam e os vírus não funcionavam; mas comemorávamos juntos cada resultado positivo; é um prazer trabalhar com vocês!

Ao IFNMG que me concedeu a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e aos órgãos de fomento, FAPEMIG, CNPq e CAPES, por apoiarem esse projeto!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Vírus Dengue (DENV).....	2
1.2 Vírus West Nile (WNV).....	5
1.3 Vírus Zika (ZIKV)	8
1.4 Alvos terapêuticos para vírus do gênero Flavivirus.....	10
1.4.1 Partícula Viral como alvo.....	10
1.4.2 Enzimas virais como alvo.....	14
1.5 Derivados da indan-1,3-diona.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral:	25
3.2 Objetivos Específicos:.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Compostos.....	27
4.2 Culturas Celulares	29
4.2.1 Células	29
4.2.2 Meio de cultura e reagentes	29
4.3 Vírus.....	29
4.3.1 Cepas Virais	29
4.3.2 Determinação dos títulos virais pelo método das placas de lise	29
4.4 Ensaio Enzimático: Inibição da NS2B-NS3 Protease.....	31
4.4.1 Triagem inibitória para WNV.....	31
4.4.2 Inibição enzimática na presença de várias concentrações do composto.....	31
4.4.3 Ensaio de Cinética Enzimática na presença do composto	32
4.4.4 Ensaio de tempo dependência.....	32
4.5 Estudo de docking com a protease de WNV e proteína E de DENV-2 e ZIKV	33

4.6 Avaliação da Citotoxicidade.....	34
4.7 Avaliação da Ação Virucida contra o vírus Dengue	36
4.8 Ensaio de Pré-tratamento	36
4.9 Ensaio de Pós-tratamento.....	37
5. RESULTADOS	39
5.1 Triagem inibitória para a protease de WNV	40
5.2 Avaliação das semelhanças estruturais entre os compostos que apresentaram atividade inibitória.....	41
5.3 Inibição Enzimática na presença de variadas concentrações dos compostos (10) e (12).....	42
5.4 Ensaio de Cinética Enzimática na presença do composto	43
5.5 Ensaio de Tempo dependência.....	44
5.6 Estudo de docking para a protease de WNV.....	45
5.7 Ensaio de Citotoxicidade.....	49
5.8 Ensaio Virucida para os vírus Dengue DENV-1-4 e ZIKV.....	50
5.9 Ensaio de pré-tratamento para os vírus DENV-2 e ZIKV	52
5.10 Ensaio de pós-tratamento para os vírus DENV-2 e ZIKV	53
5.11 Estudo de docking para a proteína E do DENV-2 e ZIKV.....	54
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	64
8. PERSPECTIVAS	66
9. REFERÊNCIAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2014, 2015 e 2016	3
Figura 2: Ciclo de transmissão do WNV: a amplificação enzoótica de WNV por pássaros e mosquitos complementada pela transmissão pássaro-pássaro e a transmissão na alimentação dos mosquitos.....	7
Figura 3: Estrutura da partícula viral de Flavivirus imatura e madura	11
Figura 4: Rearranjo dos dímeros de proteína E em baixo pH	12
Figura 5: Proteína E de Flavivirus	13
Figura 6: Genoma dos Flavivirus.....	15
Figura 7: Síntese de derivados da indan-1,3-diona contendo grupos alquilideno	28
Figura 8: Triagem inibitória para a protease do WNV	40
Figura 9: Comparação estrutural entre os compostos que apresentaram atividade inibitória.....	41
Figura 10: Inibição enzimática da protease de WNV na presença de variadas concentrações dos compostos (10) e (12)	42
Figura 11: Cinética enzimática da protease de WNV na presença dos compostos (10) e (12).....	44
Figura 12: Análise da resposta inibitória do composto (12) na presença ou ausência de incubação com a protease de WNV.....	44
Figura 13: Diagramas de interação dos compostos (10), (11), (12), (15) e (19) com a protease viral de WNV.....	47

Figura 14: Estudo de docking dos compostos (10), (11), (12), (15) e (19) com a protease viral de WNV.	49
Figura 15: Ensaio de citotoxicidade para os compostos (10) e (12) em células Vero.....	49
Figura 16: Ensaio antiviral para os compostos (10) e (12) em células Vero.....	52
Figura 17: Ensaio antiviral de pós-tratamento para os compostos (10) e (12) à 100 µM em células Vero para os vírus DENV-2 e ZIKV.	54
Figura 18: Diagramas de interação dos compostos (10) e (19) com a proteína E dos vírus DENV-2 e ZIKV.....	56
Figura 19: Estudo de docking dos compostos (10) e (12) com a proteína E do DENV-2 e ZIKV	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Interação dos compostos (10), (11), (12), (15) e (19) com a protease viral de WNV por estudo de docking.....	45
Tabela 2: Valores de CC ₅₀ , EC ₅₀ e IS dos compostos (10) e (12) na presença dos vírus DENV1-4 e ZIKV.....	50
Tabela 3: Interação dos compostos (10) e (12) com a proteína E do DENV-2 e ZIKV por estudo de docking.....	55

RESUMO

OLIVEIRA, Ana Flávia Costa da Silveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Avaliação do efeito inibitório de análogos da indan-1,3-diona contra a protease do vírus West Nile e antiviral contra os vírus Dengue e Zika.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Os flavivirus West Nile (WNV), Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) são causadores de doenças de importância epidemiológica global. Cerca de 50-100 milhões de novas infecções por DENV são estimadas para ocorrer anualmente em mais de 100 países endêmicos, com uma maior propagação documentada para áreas anteriormente não afetadas. WNV é atualmente a causa mais comum de doença neurológica causada por um arbovírus no mundo. ZIKV está associado com um aumento significativo do número de crianças nascidas com microcefalia e distúrbios neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barré. Apesar de alguns flavivirus já apresentarem vacinas disponíveis, DENV, WNV e ZIKV ainda não apresentam vacinação eficiente e global. Diante dos desafios para o desenvolvimento de uma vacina, pesquisas para terapias antivirais têm se tornado relevantes, principalmente para casos graves das três doenças. As proteínas virais NS3 e E são alvos moleculares particularmente interessante para compostos ant flavivirais devido aos seus papéis centrais no ciclo de vida viral. Neste trabalho, derivados da indan-1,3-diona foram testados contra esses alvos. Foi realizado ensaio enzimático com a protease de WNV; ensaios virucida, pré-tratamento e pós-tratamento em células Vero com os vírus DENV e ZIKV; além de estudo de docking para a proteína E do DENV e ZIKV e protease de WNV. A indan-1,3-diona (**12**) se destacou apresentando alta taxa de inibição viral e baixa toxicidade contra WNV, DENV e ZIKV, atuando como inibidor alostérico da protease de WNV e por neutralização direta do DENV e ZIKV. Sendo uma molécula obtida por um novo e mais eficiente processo sintético, é promissora e sua avaliação e aprimoramento devem ser continuadas na cadeia de etapas de validação para uma nova droga antiviral.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Ana Flávia Costa da Silveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Evaluation of the inhibition effect of indan-1,3-dione analogs against West Nile Virus protease and antiviral against Dengue and Zika virus.** Advisor: Sérgio Oliveira de Paula.

The flaviviruses West Nile (WNV), Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) cause diseases of global epidemiological importance. About 50-100 million of new DENV infections are estimated for a yearly total of 100 endemic countries, with a further documented spread to previously unaffected areas. WNV is currently the most common cause of neurological disease caused by an arbovirus in the world. ZIKV is associated with a significant increase in the number of children born with microcephaly and neurological disorders, such as Guillain-Barré syndrome. Although some flaviviruses already have available vaccines, DENV, WNV and ZIKV still do not have efficient and global vaccination. Facing the challenges for the development of a vaccine, the trials for antiviral therapies has made relevant, especially for the severe cases of the three diseases. The NS3 and E viral proteins are interesting molecular target for ant flaviviral compounds due to their central roles on the viral life cycle. In this work, indan-1,3-dione derivatives were tested against these targets. An enzymatic assay was performed with a WNV protease; virucidal, pre-treatment and post-treatment assays in Vero cells with the DENV and ZIKV viruses was performed; in addition to molecular docking for an E protein of DENV and ZIKV and WNV protease. Indan-1,3-dione (**12**) has been shown to have high viral inhibition rate and low toxicity against WNV, DENV and ZIKV, acting as an allosteric inhibitor of WNV protease and by direct neutralization of DENV and ZIKV. Being a molecule obtained by a new and more efficient synthetic process, it is promising and its evaluation and improvement should be continued in the chain of validation steps for a new antiviral drug.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus Dengue (DENV)

A Dengue surgiu nas últimas duas décadas como a mais importante e frequente arbovirose viral transmitida globalmente. O vírus dengue pertence à família Flaviviridae e tem quatro sorotipos (DENV 1-4), que são clinicamente indistinguíveis [1]. As últimas estimativas sugerem que 390 milhões de infecções por dengue ocorrem a cada ano, dos quais 100 milhões resultam em doença sintomática[2-4].

Ao longo dos últimos 30 anos, tem havido uma grande expansão na transmissão da dengue, e, atualmente, a doença é endêmica em mais de 100 países; o número de casos reportados cresceu de 2,2 milhões em 2010 para 3,2 milhões em 2015[5]. Cerca de 70% da carga global situa-se no Sul e Sudeste da Ásia. Mais recentemente, o número de casos tem sido alarmante em outras partes da Ásia, América Latina e Caribe. Apesar da dificuldade quanto a quantificação, o continente Africano também tem assistido a um significativo aumento de casos[6, 7]. Além disso, tornou-se nítido nos últimos anos que os países desenvolvidos estão em risco, com pequenos surtos sendo relatados ao sul da Europa, Estados Unidos e norte da Austrália[8].

De acordo com o Ministério da Saúde, em 2016, no Brasil foram registrados 1.496.282 casos prováveis de dengue, com uma incidência de 731,9 casos/100 mil habitantes e outros 712.396 casos suspeitos foram descartados. Até a semana epidemiológica¹ 51, foram confirmados 844 casos de dengue grave e 8.237 casos de dengue com sinais de alarme. No mesmo período de 2015, foram confirmados 1.706 casos de dengue grave e 21.591 casos de dengue com sinais de alarme (Figura 1)[9].

¹ Semana Epidemiológica: o ano é dividido em semanas epidemiológicas, iniciando a primeira no dia 01 de janeiro, totalizando 53 semanas anuais.

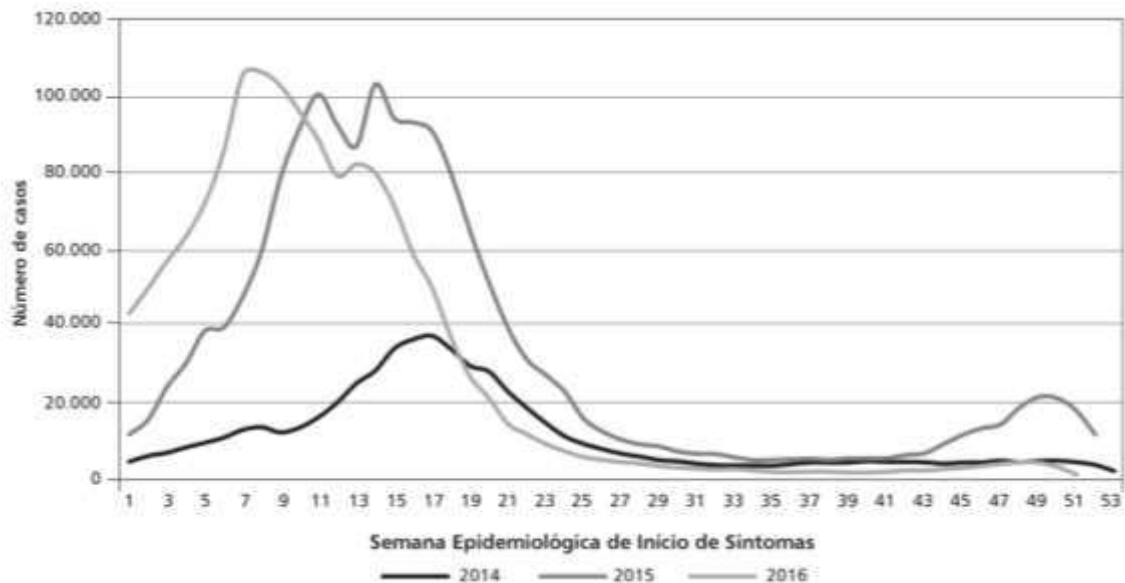


Figura 1: Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2014, 2015 e 2016[9].

Os vírus da dengue pertencem à família Flaviviridae, gênero Flavivirus, o qual inclui outros vírus de importância médica, como vírus da febre amarela, vírus West Nile, vírus da encefalite japonesa e o Zika. São vírus envelopados cujo genoma consiste de um RNA fita simples com polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb, que contém uma única janela aberta de leitura codificando uma poliproteína precursora, a qual é processada por proteases virais e do hospedeiro, dando origem a três proteínas estruturais: a proteína capsidial (C), a glicoproteína de envelope (E) e a proteína pré-membrana/membrana (prM/M); e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, as quais estão envolvidas no ciclo replicativo do vírus[10].

A infecção pelos vírus dengue pode resultar em diferentes sintomas clínicos, que vão de infecções assintomáticas até a febre hemorrágica da dengue ou a síndrome do choque da dengue. Essas variações da doença são diferenciadas de acordo com o grau de permeabilidade vascular e manifestações hemorrágicas. A

maioria das infecções sintomáticas se apresenta como a febre da Dengue clássica, com um período de incubação que pode abranger de 3 a 14 dias, mas geralmente é de 4 a 7 dias. Esta variante da doença é caracterizada por febre acompanhada de dores de cabeça, dor retro ocular, mialgia e artralgia generalizadas, anorexia, dor abdominal e náuseas. O rash cutâneo é comum e, normalmente, há uma completa recuperação do doente[11].

As manifestações graves que se desenvolvem em uma pequena proporção de pacientes infectados com dengue ocorrem relativamente tarde no decurso da doença, geralmente 4-6 dias, na altura do fim da febre. Caracterizam-se por extravasamento vascular, o que pode levar ao comprometimento hemodinâmico, choque e morte. Além disso, a hemorragia a partir de superfícies mucosas e insuficiência de órgãos na forma de hepatite, miocardite e encefalite pode ocorrer[8].

Os esforços para controlar a propagação da dengue nas duas últimas décadas têm falhado pelas dificuldades em controlar os principais vetores globais da doença: *Aedes aegypti* e, mais recentemente, *Aedes albopictus*[12]. Dessa forma, o combate à dengue representa um enorme desafio político e socioeconômico que requer uma resposta integrada em nível regional, nacional e mundial. Por esta razão, é considerada como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, sendo endêmica em muitas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na Ásia e nas Américas[2].

Ainda não há um tratamento específico para a dengue, sendo que as medidas se baseiam na manutenção do estado geral e conforto do paciente. Por esta razão, inúmeros estudos vêm sendo realizados a fim de desenvolver potenciais drogas anti-dengue[13].

1.2 Virus West Nile (WNV)

Descrito pela primeira vez em 1937 a partir de um caso de doença febril em Uganda, o WNV causou surtos pouco frequentes, tipicamente associados com doenças febris moderadas a partir da década de 1950 até a década de 1980 em Israel, Egito, Índia, França e África do Sul[14-25]. O primeiro surto da doença neuroinvasiva causada por WNV foi relatado entre idosos em Israel em 1957[20, 25]. Surtos subsequentes incluíram casos em adultos e crianças[18, 19, 23].

A partir de meados da década de 1990, a frequência, a gravidade e a extensão geográfica de surtos de WNV aumentou, com elevação também de episódios de meningite e encefalite[26-28]. O WNV cruzou o Atlântico e chegou ao hemisfério ocidental em 1999, quando um grupo de pacientes com encefalite foi relatado na área metropolitana da cidade de Nova York; em três anos, o vírus se espalhou para o Canadá e México. Este vírus também foi encontrado na América Central e do Sul através de estudos de vigilância em amostras de campo, sugerindo um risco potencial de um surto em humanos[29, 30]. Nos 77 anos desde a sua descoberta, o vírus se propagou para uma vasta região do globo e, agora, é considerado o agente causal mais importante de encefalite viral em todo o mundo[31].

Recentemente, o primeiro caso humano no Brasil do WNV foi relatado, com desenvolvimento de encefalite, no estado do Piauí. É possível que casos esporádicos tenham ocorrido em diferentes regiões do país, sem que tenha havido diagnóstico e notificação[32].

O vírus também pertence à família Flaviviridae, gênero Flavivirus, e assim como o DENV, o WNV é um vírus envelopado cujo genoma consiste de um RNA fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb que codifica sete proteínas não-estruturais e três proteínas estruturais[31].

O WNV é um vírus geneticamente e geograficamente diversificado. Quatro ou cinco linhagens genéticas distintas de WNV foram propostas com base em análises filogenéticas de isolados publicados. Seus genomas diferem uns dos outros em cerca de 20-25% e correlacionam-se bem com o ponto geográfico de isolamento[17, 33, 34]. Mantido na natureza em um ciclo de transmissão enzoótica entre aves e mosquitos, o WNV também pode infectar os seres humanos e outros vertebrados e causar doença grave e morte. As aves são consideradas os hospedeiros mais importantes para o ciclo de vida do WNV, porque elas podem desenvolver viremia suficientemente elevada para infectar mosquitos (Figura 2)[35]. A transmissão vertical por mosquitos fornece o mecanismo de latência do vírus. Os seres humanos e cavalos são contados como hospedeiros incidentais sem saída. Transmissão homem-a-homem pode vir através de transfusão de sangue, transplante de órgãos, amamentação e no útero[31]. Embora tenha sido detectado em 65 espécies de mosquitos diferentes e 326 espécies de aves nos Estados Unidos, apenas algumas espécies de mosquitos *Culex* são capazes de conduzir a transmissão do vírus para aves e humanos: *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis*[36].

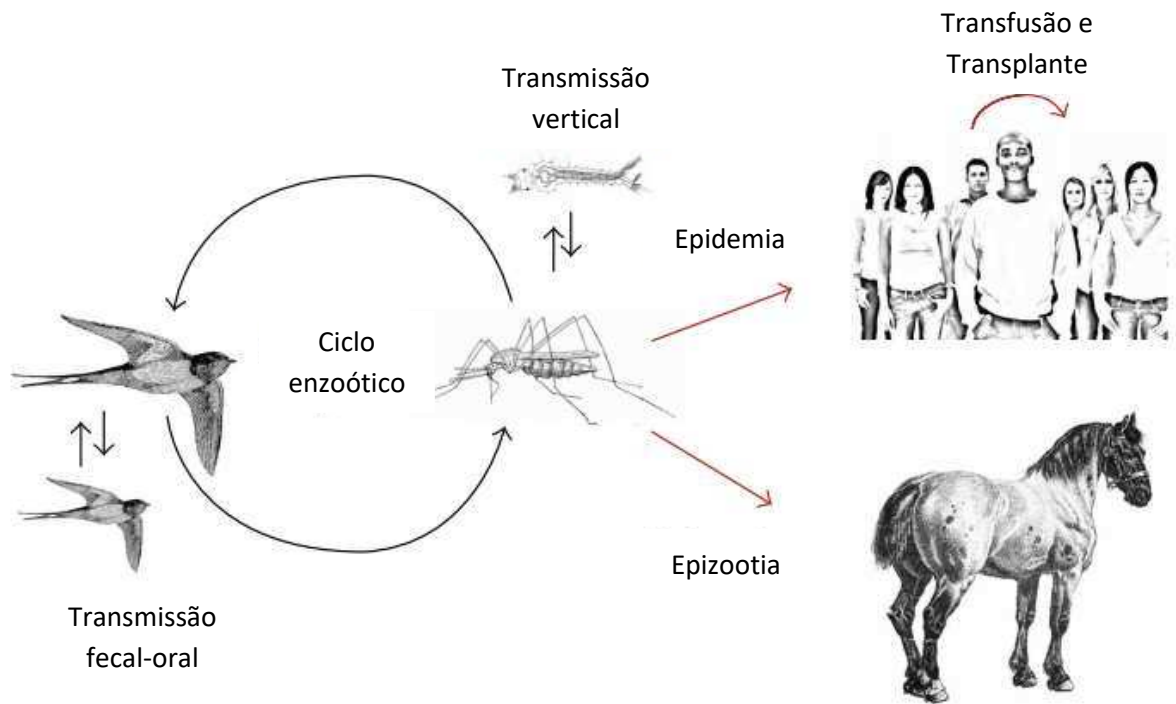


Figura 2: Ciclo de transmissão do WNV: a amplificação enzoótica de WNV por pássaros e mosquitos complementada pela transmissão pássaro-pássaro e a transmissão na alimentação dos mosquitos[31].

A maioria das infecções humanas por WNV são assintomáticas. Infecções sintomáticas podem variar de tipo gripal, mal-estar e doenças neuroinvasivas muito graves, para os quais não existe nenhum tratamento específico. Menos de 1% das infecções humanas progredem para doença grave, sendo relatados os seguintes fatores de risco: idade avançada, imunossupressão, e doenças crônicas, incluindo hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, entre outros[37-39]. A ausência de uma vacina limita a profilaxia da doença ao controle dos vetores e hospedeiros. Para cavalos, a vacina já está disponível e colabora para o controle da doença[31]. Nessa situação, a procura por uma droga antiviral eficiente torna-se importante, principalmente para o combate das doenças neuroinvasivas.

1.3 Vírus Zika (ZIKV)

ZIKV foi isolado pela primeira vez a partir de um macaco Rhesus na floresta Zika em Uganda em 1947. Os primeiros casos humanos confirmados por sorologia com anticorpos neutralizantes para ZIKV foram relatados em 1952 em Uganda e Tanzânia. Entre os anos de 1950 a 1980, o vírus se espalhou por toda a África, bem como sudeste da Ásia com casos esporádicos. Três epidemias foram relatadas com ZIKV: epidemia da Ilha Yap em 2007, da Polinésia Francesa em 2013, e do Brasil em 2015[40].

O surto da doença iniciado no Brasil em 2015 já se espalhou para mais de 50 países ao redor do mundo[41]. A pandemia teve os primeiros casos relatados em abril de 2015, sendo que oito indivíduos foram identificados como positivos para ZIKV[42]. Desde então, mais de 440 mil para 1,3 milhão de indivíduos são estimados como infectados por ZIKV. Acredita-se que o vírus possa ter sido introduzido no Brasil através da Copa do Mundo de 2014 ou por um evento internacional de canoagem [43].

No Brasil, até a semana epidemiológica 50, foram registrados 214.193 casos prováveis de febre causada pelo vírus Zika, com taxa de incidência de 104,8 casos/100 mil habitantes, distribuídos em 2.282 municípios, tendo sido confirmados 128.266 (59,9%) casos[44].

Como a maioria dos arbovírus, ZIKV mantém um complexo ciclo de transmissão entre 20 artrópodes e animais vertebrados; contudo, os mosquitos do gênero *Aedes* são os principais vetores[45]. A transmissão sexual e perinatal igualmente foram demonstradas em alguns casos[46]. Em dezembro de 2015, um relato de caso foi publicado confirmando a presença de partículas virais no sêmen de um homem de 44 anos que foi diagnosticado com infecção por ZIKV duas semanas

antes[47]. O vírus também é um Flavivirus, e alguns sintomas são semelhantes à dengue, como febre, erupção cutânea, dor nas articulações, além de sintomas neurológicos (Síndrome de Guillain-Barré) e microcefalia em recém-nascidos[40].

Embora ZIKV seja conhecido por causar uma infecção auto-limitante em adultos, a análise documentação de 73 casos de Síndrome de Guillain-Barré (GBS) durante o surto na Polinésia levantou preocupações sobre uma possível associação entre o vírus e graves complicações neurológicas[48, 49]. Da mesma forma, na epidemia brasileira em abril de 2015, o Ministério da Saúde informou aumento da frequência de GBS e, além disso, um aumento de 20 vezes na taxa de microcefalia do recém-nascido na população[50]. A associação de causalidade entre a infecção por ZIKV no primeiro trimestre da gravidez e o desenvolvimento de microcefalia ou outras anomalias congênitas foi formalmente estabelecida. Além disso, as partículas de RNA de ZIKV foram detectadas em fluido amniótico de duas mulheres com evidência radiológica de microcefalia, o que sugere que o vírus atravessou a placenta e pode estar relacionado com a produção de anomalias congênitas[51].

Sendo a infecção auto-limitada, a gestão é geralmente baseada em tratamento sintomático e repouso. Atualmente, não existem fármacos aprovados para o tratamento de ZIKV ou qualquer outro flavivírus[52]. Shan e colaboradores sugeriram a utilização de duas estratégias para desenvolver um tratamento para a infecção por ZIKV incluindo: 1) reorientar a utilização de fármacos existentes, utilizados para outras indicações clínicas, como agentes terapêuticos potenciais para ZIKV, mimetizando o que foi tentado com o vírus Ebola; 2) O desenvolvimento de inibidores de novo de infecção e replicação do ZIKV, utilizando ensaios de enzimas virais para identificar potenciais inibidores[49, 53].

1.4 Alvos terapêuticos para vírus do gênero Flavivirus

Os possíveis agentes antivirais para Flavivirus podem atuar: (i) diretamente sob a partícula viral; (ii) impedindo a adsorção e/ou entrada viral tendo como alvo estruturas do hospedeiro; e (iii) sob as enzimas virais [13, 54]. Dessas três abordagens, a segunda pode ser muito arriscada, já que os agentes antivirais apresentam como alvo estruturas do próprio hospedeiro. Existem muitas moléculas candidatas que podem atuar como receptores virais para flavivirus, tais como glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), lecitinas que reconhecem hidratos de carbono, glicoesfingolípido (GSL), proteínas com atividade de chaperona, proteínas de ligação a laminina e outras proteínas não caracterizadas. Todas elas desempenham papel importante na célula, e antivirais que atuem sobre esses possíveis receptores poderiam afetar atividades celulares no hospedeiro[55]. Diante disso serão abordadas aqui duas estratégias para o desenvolvimento de antivirais: moléculas que atuem diretamente na partícula viral e moléculas que atuam nas enzimas virais.

1.4.1 Partícula Viral como alvo

A partícula viral dos Flavivirus é pequena e icosaédrica, com aproximadamente 50 nm, e consiste de um vírus envelopado que apresenta na sua superfície duas proteínas virais: E (envelope) e M (membrana). Abaixo do envelope viral tem-se o nucleocapsídeo, composto pelo RNA de fita simples de cadeia positiva e múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C). A glicoproteína E participa da ligação e fusão durante a entrada viral. A proteína M, produzida durante a maturação do vírus nascente na via secretória, é um fragmento proteolítico do precursor prM. A partícula viral imatura é bem diferente da madura, prM cobre o peptídeo de fusão do domínio II da proteína E que está agrupada em trímeros. Durante a via secretória, ocorre a clivagem de prM pela enzima furina do hospedeiro, originando a proteína M. Em

seguida os trímeros de proteína E se rearranjam em monômeros que imediatamente se reorganizam em dímeros antiparalelos, constituindo a partícula viral madura como mostrado na figura 3 [1, 56].

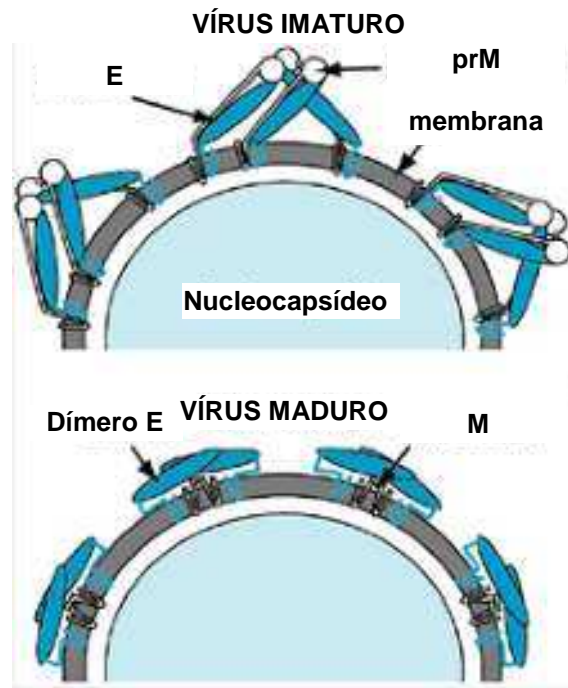


Figura 3: Estrutura da partícula viral de Flavivirus imatura e madura [1].

Os vírus se ligam a receptores celulares por meio da proteína de envelope fazendo com que essa proteína se torne um importante alvo antiviral. Ela também participa do processo de fusão do vírus à membrana celular do endossomo após a entrada do vírus na célula por vesículas de clatrina [1, 56]. Os dímeros de proteína E, devido ao baixo pH do endossomo, se rearranjam permitindo a fusão do envelope com a membrana do endossomo como visto na figura 4 [56].

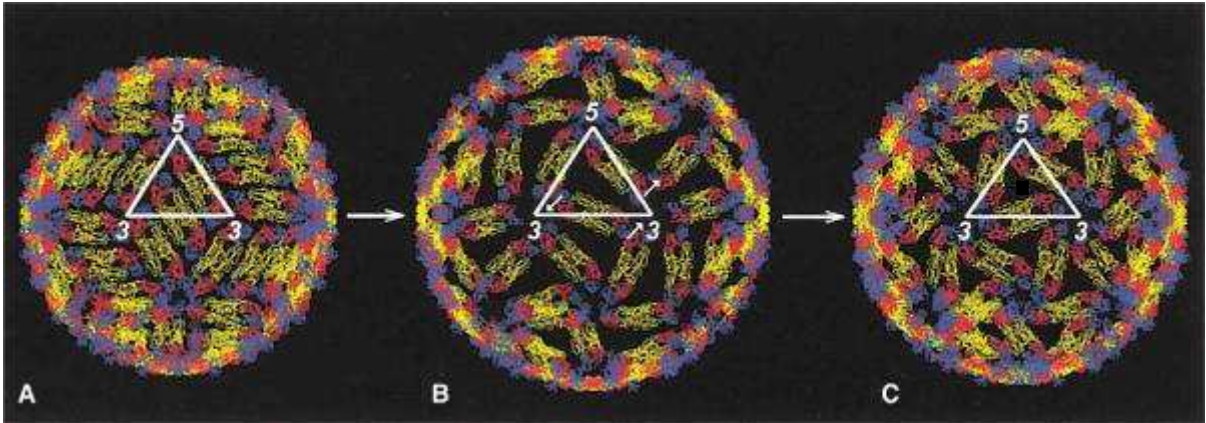


Figura 4: Rearranjo dos dímeros de proteína E em baixo pH [56]. Os dímeros da proteína E no vírus maduro (A) são mostrados sofrendo um rearranjo para a estrutura fusogênica prevista (C) com um possível intermediário (B). As setas em (B) indicam a direção da rotação de E. Observe a expansão radial da partícula em (B) e (C).

A proteína E tem três domínios distintos: um β -barril (domínio I), uma estrutura alongada (Domínio II), e uma estrutura semelhante a imunoglobulina na região C-terminal (Domínio III), mostrados na figura 5. O domínio I contém cerca de 130 resíduos em três segmentos, resíduos 1-51, 132-192 e 280-295. O domínio II é formado por dois segmentos, resíduos 52-131 e 193-279. O domínio III corresponde aos resíduos 296-403. O domínio II é responsável pela dimerização dos monômeros levando a uma interface dimérica estendida, mas interrompida, havendo "buracos" no dímero em ambos os lados do domínio II. Também ocorre interações entre os domínios I e III de cada monômero. Entre os domínios II e III há um peptídeo de fusão que é responsável pela fusão das membranas e é altamente conservado em Flavivirus sendo um importante alvo antiviral [57].

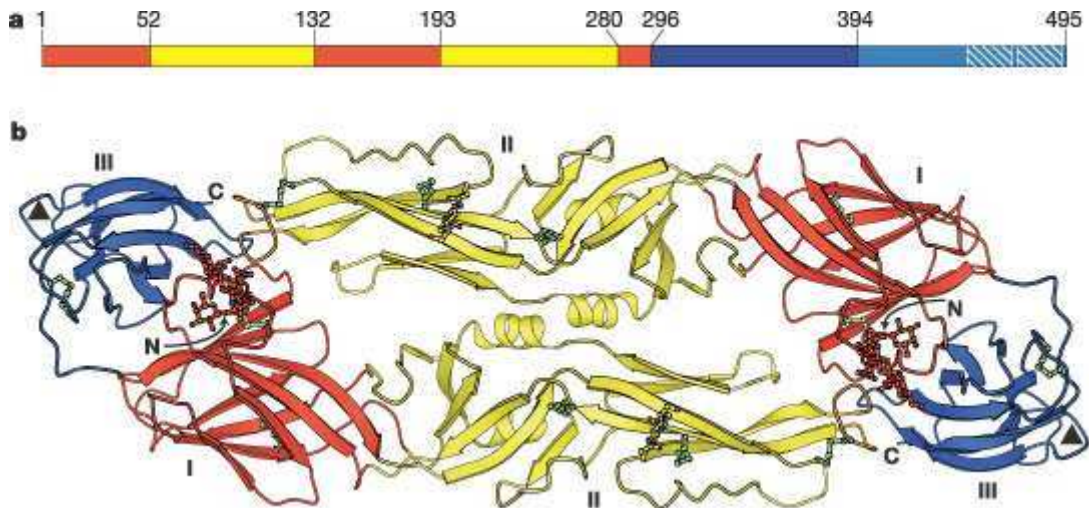


Figura 5: Proteína E de Flavivirus. A. Diagrama esquemático da organização da proteína E: domínio I (vermelho), domínio II (amarelo) e domínio III (azul). **B.** Estrutura dimérica da proteína E [58].

O pocket hidrofóbico observado na estrutura cristalina da proteína E do DENV-2, onde fica o peptídeo de fusão, tem sido um alvo antiviral para pequenas moléculas, que podem inibir as mudanças conformacionais na proteína E necessárias para o processo de fusão [59]. Vários estudos voltados para este pocket encontraram candidatos antivirais [60, 61]. Outro trabalho procurou identificar outras regiões na proteína E que poderiam atuar como possíveis alvos antivirais. Várias regiões alvo foram encontradas localizadas principalmente nas regiões de contato entre os monômeros da proteína E e que participam estabilizando a molécula. Drogas antivirais atuando nessas regiões poderiam afetar a estabilização proteica e prejudicar o rearranjo estrutural da proteína E [63].

1.4.2 Enzimas virais como alvo

As proteínas multifuncionais NS3 e NS5 do gênero Flavivirus são partes integrantes do complexo de replicação viral (RC) e estão envolvidas na síntese do RNA viral, na metilação da região 5' do genoma viral, no processamento de poliproteínas entre outras atividades. Para isso as duas proteínas não-estruturais codificam 5 enzimas virais, fundamentais para a replicação viral [64-66]. Portanto, em princípio, a inibição funcional das proteínas e/ou perturbações do RC virais, faz das proteínas NS3 e NS5 importantes alvos antivirais [13]. A inibição das enzimas virais é uma das mais bem-sucedidas abordagens para a descoberta de drogas[67].

A proteína NS3 é altamente conservada nos Flavivirus e apresenta na sua região C-terminal um nucleosídeo trifosfatado (NTPase) e uma helicase [68]; já a porção N-terminal apresenta uma serina protease que precisa da proteína NS2B como co-fator para executar suas funções [13].

NS5 é a maior e mais conservada proteína dos Flavivirus. Especificamente os resíduos 320-368 são estritamente conservados. Estes resíduos também estão relacionados com a interação com NS3[69, 70]. O papel importante da NS5 para a replicação do vírus da dengue torna essa proteína um local interessante para a inibição viral[13]. Semelhante a NS3, NS5 possui duas atividades principais, uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) na sua extremidade C-terminal e uma metiltransferase (MTase) na sua extremidade N-terminal[13, 71].

1.4.2.1 Protease

Os flavivirus apresentam como característica a formação, durante a tradução, de polipeptídeo precursor que é processado em proteínas estruturais e não estruturais. Proteases derivadas do retículo endoplasmático do hospedeiro e a

protease viral NS2B-NS3 clivam especificamente o precursor para liberar as proteínas virais individuais [1]. As proteases do DENV e WNV apresentam sítios de clivagem semelhantes [72].

A protease viral é responsável pela clivagem de alguns sítios, incluindo NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4B-NS5 (Figura 6); ela também cliva nas sequências de sinal na posição C-prM e a NS4A-NS4B, dentro da NS2A, e dentro da própria NS3 [73].

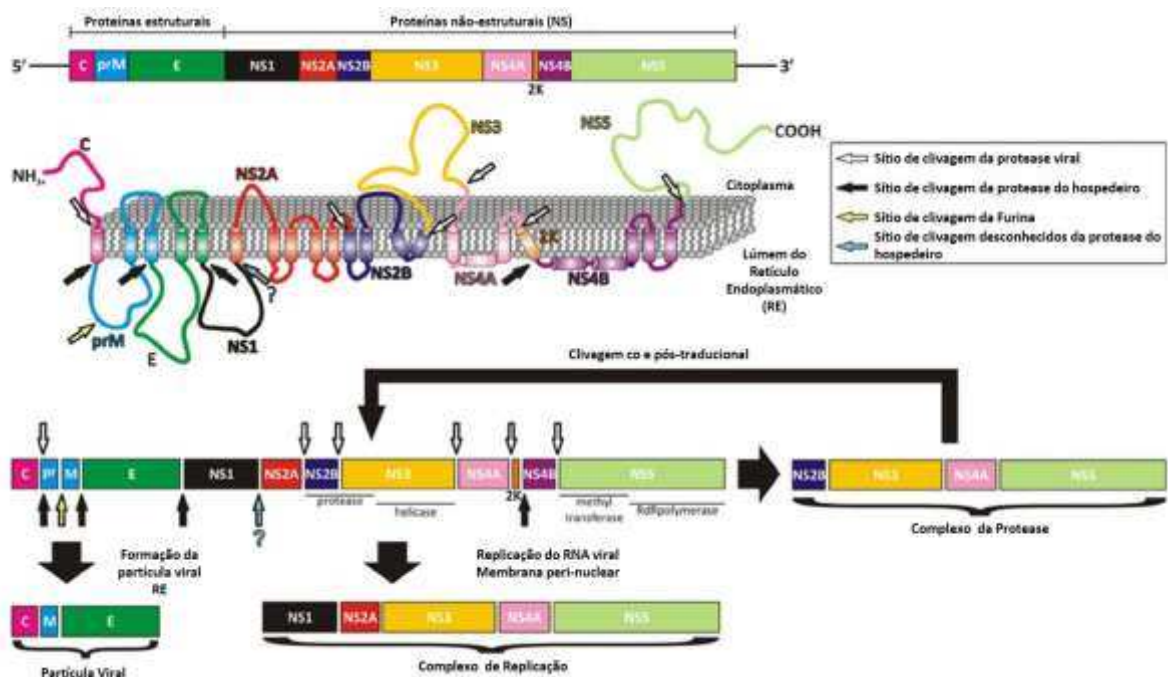


Figura 6: Genoma dos Flavivirus[74].

A protease viral (resíduos 1 a 169) é uma serina protease com a tríade catalítica Asparagina-Histidina-Serina (Asp⁷⁵-His⁵¹-Ser¹³⁵), com uma sequência de reconhecimento de substrato altamente específica, conservada em todos os Flavivirus [74, 75].

Comparações entre a protease de WNV, DENV e ZIKV indicaram que a forma de ligação do co-fator NS2B é parcialmente semelhante entre ambas[76, 77]. Outro

trabalho realizou o alinhamento das sequências de NS2B-NS3 dos vírus WNV e DENV e indicou 53% de identidade de sequência (correspondência exata de aminoácidos) e 79% de semelhança de sequências (hidrofóbico/hidrofílico) dentro dos 184 resíduos de NS3. O alinhamento dos domínios do co-fator NS2B exibiu 33% de identidade de sequência e 75% de semelhança de sequências[76].

Chambers e colaboradores mostraram que o vírus da febre amarela geneticamente modificado para conter apenas protease de NS2B-NS3 inativa é incapaz de infectar as células alvo[78]. Da mesma forma, Rothan e colaboradores mostraram que o tratamento de células com um peptídeo que inibe a protease NS2B-NS3 do vírus da dengue diminui a infecção em 80%[79]. Logo, a protease viral torna-se alvo importante para a pesquisa e desenvolvimento de antífavivirais[70].

Embora um número de grupos de pesquisa identificaram inibidores irreversíveis e reversíveis para proteases de Flavivirus, como WNV e DENV[80-84], o progresso global nesta área não foi suficiente ainda para identificar um candidato a fármaco apropriado que atue como inibidor da protease[85].

1.4.2.2 Helicase/NTPase

A região C-terminal de NS3 forma o domínio NTPase-Helicase (aminoácidos 180-618). A Helicase, como muitas outras enzimas celulares que modificam a topologia de ácidos nucleicos, é um motor molecular de direcionamento de ATP. O papel preciso do domínio NTPase/Helicase durante o ciclo de vida viral, no entanto, não é conhecido com exatidão: acredita-se que ele atue separando cadeias individuais do RNA intermediário que é transitoriamente formado durante a reação de polimerização catalisada pela polimerase viral NS5 facilitando assim outros ciclos de replicação e transcrição do genoma[86].

O domínio NTPase-Helicase de Flavivirus apresenta uma estrutura achatada com três subdomínios. Os subdomínios 1 e 2 são domínios que contêm motivos de sequência conservados para ligação a nucleotídeos e hidrólise [74]. O subdomínio 3 é revestido com aminoácidos polares que interagem com o RNA ligado e também promove a interação entre NS3-NS5. Logo afetar essa interação pode constituir uma estratégia para pesquisa e desenvolvimento de drogas antivirais [87, 88].

Os inibidores da NTPase-Helicase podem servir como uma terapia antiviral contra flavivírus e foram recentemente revistos[67]. A helicase do vírus da hepatite C (HCV), que pertence à família Flaviviridae, foi extensivamente estudada, e foi relatado a falta de pockets no RNA e nos locais de ligação de nucleotídeo com baixa toxicidade, uma vez que os compostos que visam esses locais ligam-se a muitas proteínas celulares semelhantes com atividade de NTPase-helicase[67]. A flexibilidade intrínseca das proteínas motoras também dificulta a identificação de compostos de alta afinidade e alta potência, logo a inibição alostérica torna-se um conceito atraente para a concepção de inibidores[87].

1.4.2.3 MTase

O domínio N-terminal da proteína NS5 de flavivírus (aminoácidos 1-272) funciona como uma metiltransferase dupla que apresenta duas atividades de metilação distintas: capeamento e metilação interna. Ambas utilizam S-adenosina-L-methionina (SAM) como doadoras de metil e geram S-adenosina-L-homocysteina (SAH) como produto. As MTases de flavivírus mostram um único local de ligação para SAM e exibem alta homologia à MTase do hospedeiro[89].

Todas as MTases de flavivírus conhecidos exibem uma estrutura conservada consistindo de três domínios: um domínio N-terminal, um domínio central que partilha

uma dobra estrutural com quase todas as MTases dependentes de SAM e um domínio C-Terminal. Foram identificados três locais de ligação distintos na superfície da enzima[90].

Estudos funcionais mostraram que a metilação no nucleotídeo 7 (N-7) da região cap do RNA é crítica para uma tradução eficiente[91]. Mutações da MTase que eliminam a metilação de N-7 foram letais para a replicação de flavivírus, sugerindo que a MTase é um potencial alvo antiviral [92].

A riqueza das informações estruturais forneceu uma base sólida para abordagens antivirais guiadas por estruturas. Os domínios centrais de várias MTases são conservados, permitindo a obtenção de inibidores seletivos de flavivírus que não inibem as MTases do hospedeiro[90].

1.4.2.4 RdRp

RdRp flaviviral está localizada na região C-terminal da proteína NS5 e é essencial para a replicação viral. A RdRp é um dos melhores alvos para o desenvolvimento de antivirais de ação direta [93]. Nas células infectadas, a RdRp do DENV sintetiza primeiro um RNA de sentido negativo e forma um intermediário de RNA de cadeia dupla. A cadeia negativa atua então como molde para a produção do genoma do RNA de sentido positivo [94]. A polimerase viral é capaz de gerar novos RNAs na ausência de um primer, um processo chamado síntese de novo de RNA. A síntese de RNA mediada por RdRp prossegue em três passos: iniciação de novo, transição e alongamento[95]. Em seguida, a proteína sofre uma alteração conformacional de transição da iniciação de novo para o estado de alongamento. Finalmente, continua a síntese de RNA sob um modo de alongamento processado, isto é, sem dissociar significativamente do seu modelo de RNA[96].

Os inibidores de polimerases virais clinicamente validados podem ser inibidores tanto de nucleosídeos quanto de não nucleosídeos. Os inibidores de nucleosídeos são os mais utilizados em medicamentos antivirais comercializados e atuam bloqueando a montagem da fita de RNA durante a replicação [97]. Antes que um nucleosídeo possa terminar uma cadeia de RNA viral, ele precisa penetrar na célula, ser convertido ao seu derivado trifosfato, ser reconhecido pela polimerase, e incorporado na cadeia de RNA viral [54]. Por outro lado, os inibidores não nucleosídicos atuam alostericamente bloqueando a atividade da polimerase, e muitas vezes se ligam diretamente à polimerase e podem ser melhorados pelo projeto racional de design baseado na estrutura [89].

1.5 Derivados da indan-1,3-diona

A indan-1,3-diona é membro importante da classe dos chamados compostos 1,3-dicarbonilados, cujo núcleo estrutural está presente em uma vasta gama de moléculas de interesse químico e farmacêutico[98, 99]. A indan-1,3-diona e os seus derivados constituem um grupo de compostos que tem atraído a atenção devido a traços característicos[100, 101]:

- Indan-1,3-diona tem importância no que tange à síntese orgânica devido à presença da estrutura β -dicarbonila que muitas vezes serve como um bloco de construção para a preparação de compostos mais complexos por meio de reações de condensação, decomposição, redução, ciclização, rearranjos, entre outros.

- Apresenta uma vasta gama de propriedades biológicas, incluindo antimicrobianas, anti-tumoral, anti-inflamatória, antiviral dentre outras[102-113].

Sobre a atividade antiviral especificamente, Artico e colaboradores sintetizaram derivados da indan-1,3-diona eficientes em inibir a enzima integrase do vírus HIV 1[111]. Vários trabalhos indicam a ação de derivados da indan-1,3-diona contra o papilomavírus humano (HPV)[109, 112, 113]. Derivados da indan-1,3-diona também foram testados contra o vírus da hepatite C (HCV). Foram encontrados 4 derivados eficientes capazes de inibir a protease do vírus[108].

No presente trabalho foi proposto a avaliação de derivados da indan-1,3-diona contendo grupos alquilideno.

2. JUSTIFICATIVA

Durante as últimas cinco décadas, a incidência da dengue aumentou cerca de 30 vezes no mundo. Cerca de 50-100 milhões de novas infecções são estimadas para ocorrer anualmente em mais de 100 países endêmicos, com uma maior propagação documentada para áreas anteriormente não afetadas. Todos os anos, centenas de milhares de casos graves surgem, incluindo 20.000 mortes; 264 anos de vida ajustados por incapacidade por milhão de habitantes por ano são perdidos, a um custo estimado para casos ambulatoriais e hospitalizados de US\$ 514 a 1394 por caso, afetando frequentemente populações muito pobres. Os verdadeiros números são provavelmente muito piores, uma vez que a subnotificação de casos de dengue é uma realidade[2, 114-116].

O WNV, desde o seu isolamento inicial em Uganda em 1937, tornou-se uma importante causa de doenças humanas e animais em todo o mundo. WNV, também do gênero Flavivirus, tem aumentado sua distribuição geográfica, atingindo a África, Oriente Médio, sul da Europa, Rússia ocidental, sul da Ásia ocidental, Austrália e América do Norte. Pode causar doença neurológica grave resultando em sequelas ou morte[31, 117]. Recentemente, o primeiro caso humano de WNV foi relatado no Brasil, com desenvolvimento de encefalite, no estado do Piauí. É possível que casos esporádicos ou pequenos grupos da doença WNV já tenham ocorrido em diferentes regiões do país e permaneceram não diagnosticada[118]. Entretanto, a circulação do vírus já havia sido confirmada no Brasil em uma investigação que estudou equinos e aves no período de 2008-2010[32]. WNV é agora a causa mais comum de doença neurológica causada por um arbovírus no mundo[31].

O vírus Zika, desde que surgiu no Brasil em maio de 2015, tem gerado preocupação global devido à sua associação com um aumento significativo do número

de crianças nascidas com microcefalia e distúrbios neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barré[48, 49]. Mais de 440 mil para 1,3 milhão de indivíduos são estimados como infectados por ZIKV em 2015, e sua distribuição global já ultrapassou 50 países [43].

Apesar de alguns flavivirus já apresentarem vacinas disponíveis, DENV, WNV e ZIKV ainda não apresentam vacinação eficiente e global. Diante dos desafios para o desenvolvimento de uma vacina, pesquisas para terapias antivirais têm se tornado relevantes, principalmente para casos graves das três doenças. O desenvolvimento de terapias antinflavivirais continua a ser uma alta prioridade para a Organização Mundial da Saúde[54, 119]. O uso de drogas antivirais durante epidemias pode diminuir a carga viral, reduzindo a infecção do agente transmissor e consequentemente a propagação da doença.

Nesse trabalho foi realizado uma avaliação inibitória de derivados da indan-1,3-diona contra a protease de WNV e antiviral contra os vírus DENV e ZIKV, tentando elucidar seu mecanismo de ação. O particular interesse nesta classe de compostos se deve ao seu variado espectro de atividade biológica [102, 104-113].

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade inibitória de 17 derivados da indan-1,3-diona contra a protease do vírus WNV e antiviral contra os vírus DENV e ZIKV.

3.2 Objetivos Específicos:

- Realizar a triagem da atividade inibitória dos 17 derivados da indan-1,3-diona contra a protease viral do WNV;
- Identificar os compostos mais promissores e realizar a análise de inibição enzimática na presença de variadas concentrações destes compostos para obtenção do IC₅₀;
- Identificar o mecanismo de inibição dos compostos mais promissores para WNV;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos selecionados na triagem em células VERO;
- Avaliar se os compostos eficientes para a protease apresentam o mesmo comportamento para ensaios antivirais em cultura celular para o vírus DENV e ZIKV;
- Estudo de docking do modo de interação dos compostos selecionados com a protease viral NS2B-NS3 de WNV;
- Estudo de docking do modo de interação dos compostos selecionados com as proteínas virais E do DENV-2 e ZIKV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

4.1 Compostos

No presente trabalho foi proposto a avaliação de derivados da indan-1,3-diona contendo grupos alquilideno. A síntese destes compostos (estrutura geral 2) foi realizada via reação de condensação de Knoevenagel [120] entre a indan-1,3-diona **(1)** e diferentes aldeídos aromáticos originando 17 compostos: **(3)** a **(19)** e foi realizada no Laboratório de Química Supramolecular da Universidade Federal de Viçosa coordenado pelo professor Róbson Ricardo Teixeira. As reações foram conduzidas em água e catalisadas por $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ [121], conforme mostrado na Figura 7.

Todos os compostos foram solubilizados em DMSO 100% e no momento de uso foram diluídos em meio para uma concentração final de DMSO de 1%, garantindo a ausência de toxicidade ou inibição em decorrência do DMSO.

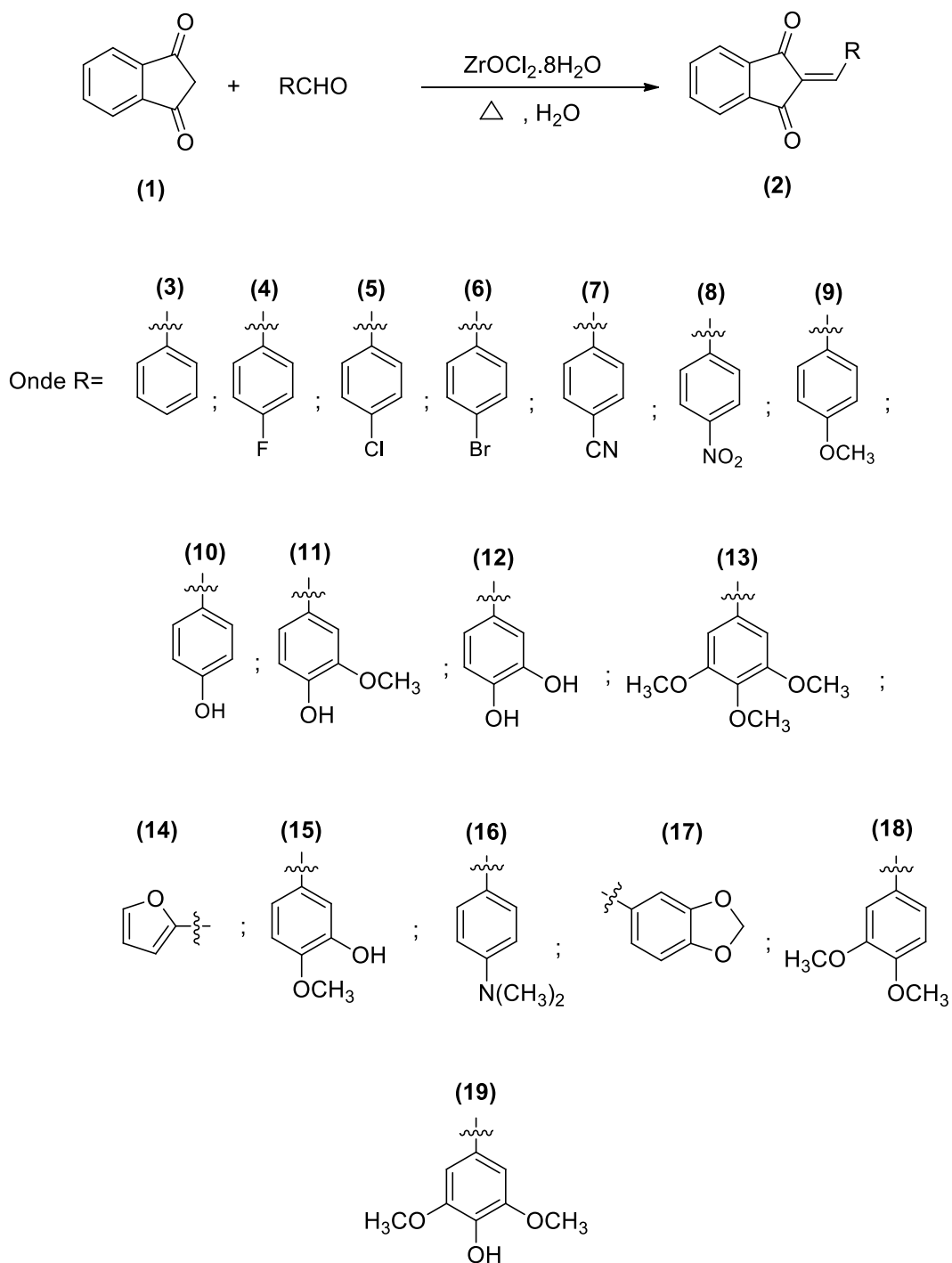


Figura 7: Síntese de derivados da indan-1,3-diona contendo grupos alquilideno.

4.2 Culturas Celulares

4.2.1 Células

Para a realização dos experimentos foram utilizadas células VERO, que são culturas contínuas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e células de inseto *Aedes albopictus* C6/36.

4.2.2 Meio de cultura e reagentes

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o meio DMEM. Este meio foi suplementado com soro fetal bovino (SFB) na proporção de 10% para promoção do crescimento e 2% para manutenção da linhagem celular. Para prevenir a contaminação das culturas de células por bactérias e fungos, foi adicionado ao meio 1% de PSA (10.000 U de Penicilina, 10.000 µg de Estreptomicina e 25 µg de Anfotericina B). Para a obtenção de subculturas celulares, manutenção das células e realização dos experimentos com células VERO, foi utilizado como agente dissociante a tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em solução de EDTA 1:250).

4.3 Vírus

4.3.1 Cepas Virais

Os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, das cepas Nauru Island, New Guinea C, H-87 e H-241 respectivamente, foram obtidas do estoque viral do Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. A cepa de ZIKV, isolada em Pernambuco, foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. Rafael Freitas de Oliveira França da Fiocruz Pernambuco.

4.3.2 Determinação dos títulos virais pelo método das placas de lise

Células VERO, em uma densidade de 8×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 24 poços, com meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após confluência, essas células foram infectadas com 100 µL de diluições decimais seriadas dos estoques virais (diluições de 10^{-1} a 10^{-7}), em meio DMEM sem SFB (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas por 1 hora, sob agitação para uma melhor distribuição viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e foi adicionado a cada cavidade 1500 µL de uma solução CMC 3% em meio DMEM (duas vezes concentrado) acrescido de 2% de SFB e 1% de PSA. As placas foram incubadas por 5-6 dias. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 2 a 3 gotas do corante cristal violeta 5% por 40 minutos, a temperatura ambiente, em agitador mecânico. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas colocadas para secar à temperatura ambiente, sendo quantificadas através da visualização de placas de lise a olho nu. Para calcular o título, foram contadas as placas de lise na última diluição que apresentou placas. O título viral foi expresso em unidades formadoras de placas/mL (UFP/mL), e, portanto, de partículas virais, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante. O título viral foi calculado por meio da equação:

$$TV = NP \times \frac{1}{d} \times \frac{1}{V}$$

Em que:

TV = Título viral

NP = Número de pacas formadas na última diluição que apresenta placas de lise

d= Última diluição viral que apresenta placas

V= Volume da diluição viral utilizada para infectar a monocamada celular

4.4 Ensaio Enzimático: Inibição da NS2B-NS3 Protease

Foi utilizada a NS2B-NS3 protease do vírus WNV purificada e ativada fornecida pela R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), Recombinant Viral WNV NS3 Protease (número de catálogo 2907-SE). Como substrato fluorescente foi utilizado o pERTKR-AMC (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA, número de catálogo ES013).

4.4.1 Triagem inibitória para WNV

A fim de investigar se o composto é capaz de inibir a WNV NS2B-NS3 protease, um total de 50 μL da NS2B-NS3-protease purificada (concentração final de 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$) diluída em solução tampão (50 mM Tris, 30% (v/v) Glicerol, pH 9,5) foi incubada com 50 μL de solução do composto (concentração final de 16,6 μM) em uma placa preta de 96 poços durante 30 min a 21-22 $^{\circ}\text{C}$ antes do início da reação por adição de 50 μL do substrato na concentração de 40 μM . Um controle positivo sem o composto foi testado na mesma placa, com 50 μL de tampão, além de um controle negativo com 1% de DMSO. O branco continha 100 μL de tampão e 50 μL do substrato. A intensidade de fluorescência foi registrada continuamente em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm usando leitor SpectraMax® M5 (Molecular Devices) de fluorescência. Os compostos com melhor eficiência de inibição enzimática foram selecionados para os testes seguintes. A análise dos resultados foi conduzida através do programa Graphpad Prism 6 utilizando o teste de comparações múltiplas one-way ANOVA.

4.4.2 Inibição enzimática na presença de várias concentrações do composto

A fim de investigar a inibição da WNV NS2B-NS3 protease, um total de 50 μL da NS2B-NS3-protease purificada (concentração final de 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$) foi incubada com 50 μL do composto, 8 diluições seriadas (concentração final de 66, 33, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 μM) em uma placa preta de 96 poços durante 30 minutos à temperatura de 21-22 $^{\circ}\text{C}$ antes

do início da reação por adição de 50 μL do substrato para a concentração final de 40 μM . Um controle positivo sem o composto foi testado na mesma placa, com 50 μL de tampão (50 mM Tris, 30% (v/v) Glicerol, pH 9,5). O branco continha 100 μL de tampão e 50 μL do substrato. A intensidade de fluorescência foi registrada continuamente em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm usando um leitor SpectraMax[®] M5 (Molecular Devices). O valor de IC_{50} foi calculado utilizando o Graphpad Prism 6 através da equação de Hill.

4.4.3 Ensaio de Cinética Enzimática na presença do composto

A fim de investigar a variação da velocidade enzimática e do K_M da WNV NS2B-NS3 protease, um total de 50 μL da NS2B-NS3-protease purificada (concentração final de 1 ng/ μL) foi incubada com 50 μL do composto na concentração final de 16,6 μM , em uma placa preta de 96 poços durante 30 min à temperatura ambiente (21-22 °C) antes do início da reação por adição de 50 μL do substrato em várias concentrações (20, 40, 60, 80 e 100 μM). Um controle positivo sem o composto foi testado na mesma placa, com 50 μL de tampão (50 mM Tris, 30% (v/v) Glicerol, pH 9,5), além de um controle negativo com 1% de DMSO. O branco continha 100 μL de tampão e 50 μL do substrato. A intensidade de fluorescência foi registrada continuamente em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm usando o mesmo leitor M5 de fluorescência. O valor da V_{MAX} e K_M foram calculados utilizando o Graphpad Prism 6 através da Equação de Michaelis-Menten. Posteriormente foi gerado o gráfico de Lineweaver-Burke.

4.4.4 Ensaio de tempo dependência

A fim de investigar se a inibição da WNV NS2B-NS3 protease é tempo dependente, um total de 50 μL da NS2B-NS3-protease purificada (concentração final de 1 ng/ μL) foi incubada com 50 μL do composto com o composto **(12)** a 100 μM em uma

placa preta de 96 poços durante 30 minutos à temperatura de 21-22 °C antes do início da reação por adição de 50 µL do substrato para a concentração final de 40 µM. Também foi adicionado à 50 µL da NS2B-NS3-protease purificada (concentração final de 1 ng/µL), 50 µL do composto com o composto **(12)** a 16,6 µM em uma placa preta de 96 poços iniciando a reação por adição de 50 µL do substrato para a concentração final de 40 µM imediatamente após a adição do composto. Um controle positivo sem o composto foi testado na mesma placa, com 50 µL de tampão (50 mM Tris, 30% (v/v) Glicerol, pH 9,5). O branco continha 50 µL de tampão e 50 µL do substrato. A intensidade de fluorescência foi registrada continuamente em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm usando um leitor SpectraMax® M5 (Molecular Devices).

4.5 Estudo de docking com a protease de WNV e proteína E de DENV-2 e ZIKV

A estrutura cristalográfica de WNV NS2B-NS3pro, proteína E de DENV-2 e proteína E de ZIKV foram obtidas no Protein Data Bank (PDB) sob os códigos 2IJO, 1OKE e 5JHM, respectivamente. Para a protease, como as análises seriam realizadas apenas com a porção NS3, foi utilizado o software PyMol (Molecular Graphics System, Version 1.7.4.5) para remover a porção NS2B e também o ligante vinculado ao sítio ativo que integra o arquivo original do PDB.

Do pacote de programas Schrodinger, LLC, New York, NY -2016-2, foram utilizados os aplicativos:

- Sketcher, para desenhar as moléculas dos ligantes: compostos **(10)**, **(11)**, **(12)**, **(15)** e **(19)**;
- Ligand Preparation, para atribuição da configuração tridimensional, carga e pH (7 ± 2) aos ligantes: para o docking com a protease foram utilizados os compostos

(10), (11), (12), (15) e (19); para o docking com a proteína E foram utilizados os compostos (10) e (12);

- Protein Preparation Wizard, para adicionar hidrogênios, remover moléculas de água, atribuir carga, minimizar a molécula e adicionar átomos ausentes na cadeia;
- Receptor Grid Generation, para determinar o grid (área do receptor onde os testes de ligação são realizados): toda a molécula do receptor foi considerada como grid para encontrar a região mais provável de ligação, levando-se em conta toda a molécula;
- Glide, para realizar efetivamente o docking com os seguintes parâmetros: em relação à precisão dos testes de ligação utilizou-se o SP (Standad Precision); o ligante foi atribuído como flexível; as atribuições de carga e pH do ligante e receptor foram consideradas.

Esses aplicativos trabalham de forma integrada na plataforma Maestro, que além de servir como entrada e manipulação dos arquivos, permite a visualização e processamento dos resultados.

A escolha da melhor pose de ligação foi feita usando um modelo de score energético que combina a energia do grid score, a predição de afinidade de ligação feita pelo GlideScore, e a força de energia interna do modelo usado para direcionar o algoritmo de busca conformacional.

4.6 Avaliação da Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade dos compostos teste selecionados foi realizada sobre células VERO. Foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT.

Uma suspensão de células VERO, contendo aproximadamente 1×10^4 células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de

96 cavidades por poço (100 µL/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C. Após 24 h, com a monocamada celular confluyente, o meio DMEM foi substituído por 100 µL das diversas concentrações dos compostos teste diluídos em meio DMEM incompleto (100, 50, 25, 12, 6 e 3 µM). A placa foi incubada por 24 h a 37 °C. O meio foi então removido e foi adicionado 50 µL de MTT (1 mg/mL), e foi incubada novamente por 4 h. O meio com MTT foi removido e substituído por 100 µL de DMSO 0,1 M/cavidade, a placa foi agitada por 10 minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A absorbância obtida foi diretamente proporcional à viabilidade celular, a qual foi calculada utilizando-se as absorbâncias das monocamadas tratadas com material-teste, comparados ao controle celular utilizando a seguinte fórmula:

$$V(\%) = \frac{DO_{mt}}{DO_{cc}} \times 100$$

Em que:

V(%) = Viabilidade celular em porcentagem

DO_{mt} = Densidade óptica do material testado

DO_{cc} = Densidade óptica do Controle Celular

Os valores de CC₅₀, ou seja, a concentração de cada material teste que reduziu em 50% a viabilidade celular foi obtida por análise de regressão dos percentuais referentes às diferentes concentrações dos compostos. Os testes foram feitos no Graphpad Prism 6 e os valores de CC₅₀ representaram a média de três experimentos independentes.

4.7 Avaliação da Ação Virucida contra o vírus Dengue

Células VERO foram cultivadas em placas de 24 cavidades conforme descrito no item 4.2.2. 100 µL de suspensão viral (50 – 100 UFP) foram incubados com 100 µL de variadas concentrações dos compostos testes (3, 6, 12, 25, 50 e 100 µM) e incubados a 37 °C por 1 h. O meio foi retirado por aspiração das placas e foram adicionados 100 µL da mistura de vírus e composto à monocamada celular. As placas foram incubadas por 1 hora, sob agitação para uma melhor distribuição viral. Após esse tempo, a suspensão viral misturada às variadas concentrações do composto foi aspirada e foi adicionado a cada cavidade 1500 µL de uma solução CMC 3% em meio DMEM (duas vezes concentrado) acrescido de 2% de SFB e 1% de PSA. As placas foram incubadas por 5-6 dias. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas como descrito no item 4.2.2. Neste ensaio foi possível calcular o valor do EC₅₀ através de regressão dos percentuais de inibição referentes às diferentes concentrações dos compostos teste com o Graphpad Prism 6. Com o valor de CC₅₀ e EC₅₀ foi possível calcular o valor do índice de seletividade (IS), que corresponde à razão do CC₅₀ sobre o EC₅₀.

4.8 Ensaio de Pré-tratamento

Células VERO foram cultivadas em placas de 96 cavidades (5,0 x 10³ células/mL, 100 µL/cavidade) até confluência (24 h) usando meio MEM suplementado com 5 % de SFB, e incubados a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações dos compostos 10 e 12 (100, 50, 25, 12, 6 e 3 µM), que ficaram em contato com o tapete celular por 3 h a 37 °C com 5% de CO₂. Decorrido este período, os compostos foram cuidadosamente aspirados e foram adicionados 200 µL da suspensão viral (MOI=2). Na mesma placa,

foram realizados controle celular (100 µL meio/cavidade) e controle viral (200 µL suspensão viral/cavidade, MOI=2). As placas foram incubadas por 4 horas nas mesmas condições citadas anteriormente para adsorção viral. Posteriormente o sobrenadante foi removido e foi adicionado 200 µL de meio incompleto. As placas foram incubadas por 96 h nas mesmas condições citadas anteriormente. Passado esse período, o meio foi aspirado e foi adicionado 50 µL de MTT (1 mg/mL), e foi incubada novamente por 4 h. O meio com MTT foi removido e substituído por 100 µL de DMSO 0,1 M/cavidade, a placa foi agitada por 10 minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada material teste foram transformados em porcentagem (x %) em relação aos controles celular e viral, por meio da seguinte fórmula:

$$x \% = \frac{(\text{DO material teste} - \text{DO controle viral})}{(\text{DO controle celular} - \text{DO controle viral})} \times 100$$

4.9 Ensaio de Pós-tratamento

Células VERO foram cultivadas em placas de 96 cavidades (5,0 x 10³ células/mL, 100 µL/cavidade) até confluência (24 h) usando meio MEM suplementado com 5 % de SFB, e incubados a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µL da suspensão viral (MOI=2). Na mesma placa, foram realizados controle celular (100 µL meio/cavidade) e controle viral (200 µL suspensão viral/cavidade, MOI=2). As placas foram incubadas por 4 horas nas mesmas condições citadas anteriormente para adsorção viral. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 200 µL das diferentes concentrações dos compostos 10 e 12 (100, 50, 25, 12, 6 e 3 µM). As placas foram incubadas por 96 h nas mesmas condições citadas anteriormente. Decorrido esse período, os compostos foram

aspirados e foram adicionados 50 μL de MTT (1 mg/mL), e foi incubada novamente por 4 h. O meio com MTT foi removido e substituído por 100 μL de DMSO 0,1 M/cavidade, a placa foi agitada por 10 minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os cálculos foram realizados de acordo com o apresentado no item 4.7.

5. RESULTADOS

5.1 Triagem inibitória para a protease de WNV

Para realizar a triagem da ação inibitória dos 17 derivados da indan-1,3-diona, foi utilizado ensaio enzimático com a protease do WNV. A enzima foi incubada por 30 minutos com os compostos teste. Posteriormente a reação foi iniciada com a adição do substrato fluorescente pERTKRAMC e foi realizada a leitura em Unidades Relativas de Fluorescência (RFU) em leitor de microplacas.

Dos 17 derivados da indan-1,3-diona, os compostos **(10)**, **(11)**, **(12)**, **(15)** e **(19)** apresentaram comportamento inibitório, com redução de cerca de 41, 15, 100, 2 e 16% de inibição da atividade enzimática respectivamente na concentração única de 16,6 μ M do composto (Figura 8).

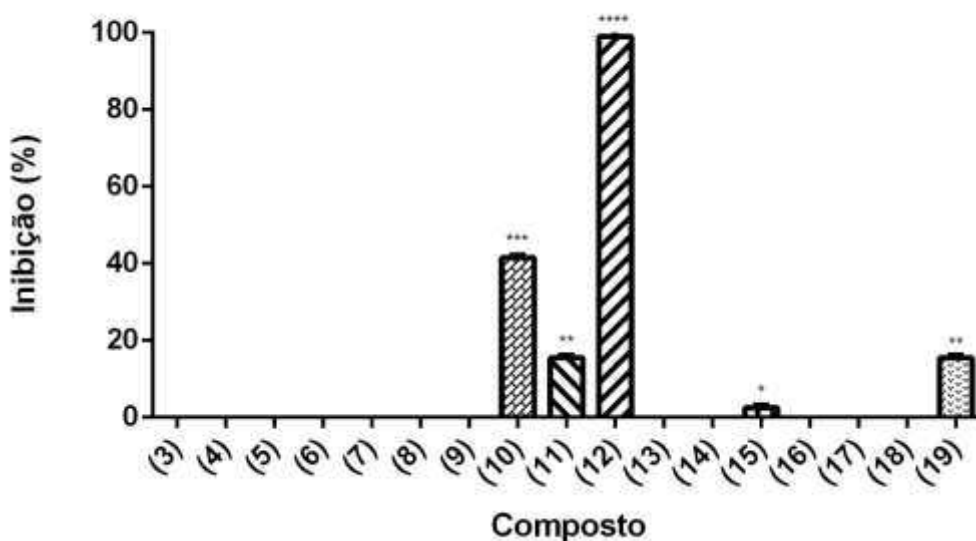


Figura 8: Triagem inibitória para a protease do WNV. Dezesete derivados da indan-1,3-diona foram analisados na concentração única de 16,6 μ M contra a protease do WNV. Foi utilizado teste estatístico de comparações múltiplas one-way ANOVA, com valor de $p < 0,05$.

5.2 Avaliação das semelhanças estruturais entre os compostos que apresentaram atividade inibitória

Buscando verificar se havia semelhanças estruturais entre os compostos que apresentaram atividade inibitória, observou-se que todos possuíam um grupo hidroxila na posição para ou meta do anel aromático da porção alquilideno da indan-1,3-diona. Destaca-se na figura 9 em vermelho (posição para) e azul (posição meta) os grupos hidroxila. Observou-se também que **(12)**, o qual apresentou melhor resposta inibitória, apresenta hidroxilas nas duas posições.

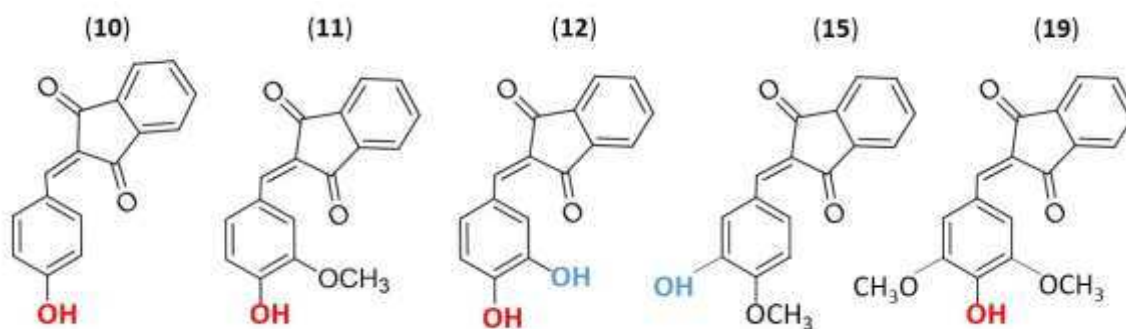


Figura 9: Comparação estrutural entre os compostos que apresentaram atividade inibitória. Em vermelho, destaque para o grupo hidroxila presente na posição para, e em azul, destaque para o grupo hidroxila presente na posição meta do anel aromático na porção alquilideno da indan-1,3-diona dos compostos com atividade inibitória.

Os compostos **(10)** e **(12)**, por apresentarem melhor atividade inibitória, foram selecionados para os ensaios seguintes.

5.3 Inibição Enzimática na presença de variadas concentrações dos compostos (10) e (12)

A inibição enzimática da protease de WNV foi avaliada nas concentrações de 66, 33, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 μM dos compostos (10) e (12). Os dois compostos apresentaram inibição dose-resposta com valores de IC_{50} de 11,27 e 3,19 μM , respectivamente (Figura 10).

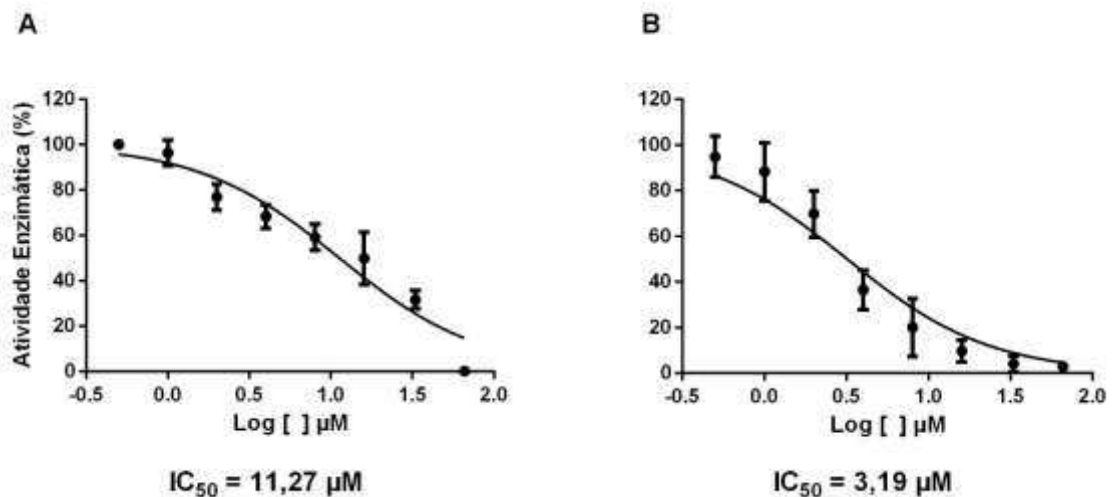


Figura 10: Inibição enzimática da protease de WNV na presença de variadas concentrações dos compostos (10) e (12). A inibição enzimática foi analisada na presença de sete concentrações (concentração final de 33 μM a 0,5 μM) dos compostos (10) e (12), em A e B, respectivamente. O cálculo da regressão teve como base o coeficiente de Hill. Os valores de IC_{50} dados estão em μM . O valor do R^2 foi de 0,91 e 0,90 para (10) e (12), respectivamente.

5.4 Ensaio de Cinética Enzimática na presença do composto

O ensaio de cinética enzimática foi conduzido empregando-se variadas concentrações de substrato. Foi utilizada a equação de Michaelis-Menten para que o valor de velocidade máxima e K_M fossem encontrados. Posteriormente, o gráfico de Lineweaver-Burk foi construído.

Os compostos **(10)** e **(12)** promoveram a diminuição significativa da velocidade máxima enzimática sem alterações dos valores de K_M como pode ser visto na figura 11. O gráfico de Lineweaver-Burk apresentou retas que se cruzam no eixo x para ambos compostos. Os valores de K_i foram de 12,31 e 1,25 μM para **(10)** e **(12)** respectivamente.

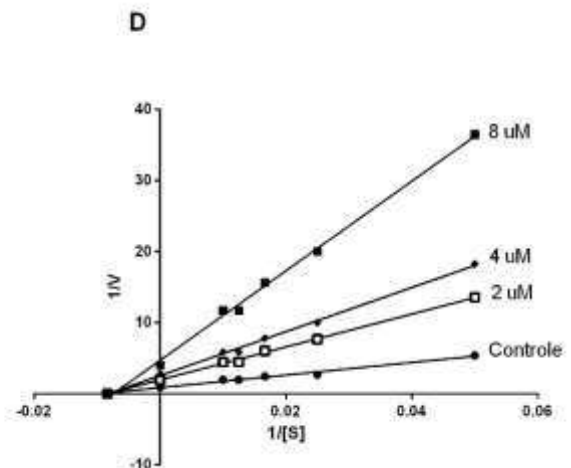
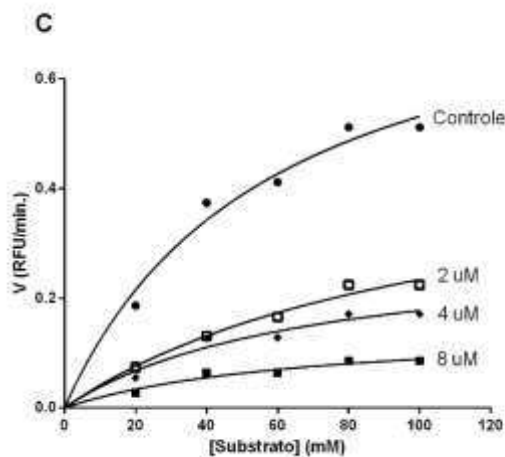
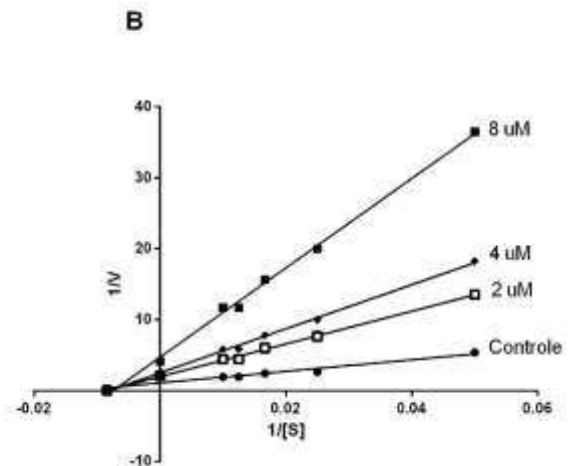
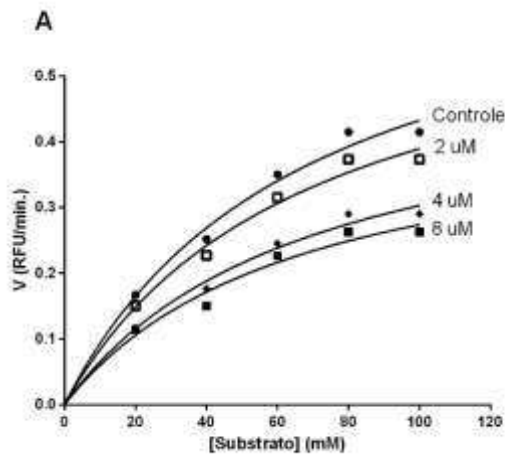


Figura 11: Cinética enzimática da protease de WNV na presença dos compostos (10) e (12). Em **A** e **C** estão os gráficos de Michaelis-Menten para os compostos **(10)** e **(12)**, respectivamente. Em **B** e **D** estão os gráficos de Lineweaver-Burk para os compostos **(10)** e **(12)**, respectivamente. Em todas as curvas dos gráficos de Michaelis-Menten e em todas as retas do gráfico de Lineweaver-Burk o valor do R^2 foi maior que 0,90.

5.5 Ensaio de Tempo dependência

Para verificar se a inibição da protease de WNV ocorria em dependência do tempo, o ensaio foi conduzido com a enzima viral e 100 μM do composto **(12)** incubados ou não por 30 minutos antes do início da reação por adição do substrato.

Os resultados mostraram que não houve diferença na resposta inibitória do composto **(12)** na presença ou ausência de incubação como pode ser visto na figura 12.

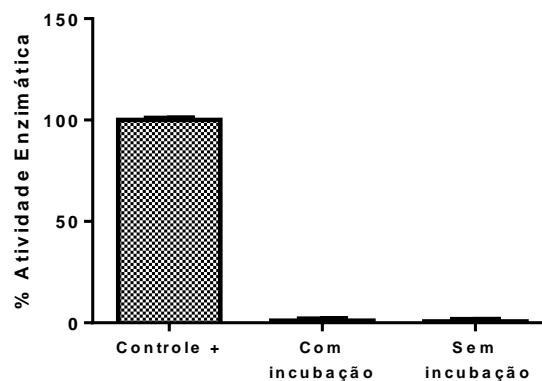


Figura 12: Análise da resposta inibitória do composto (12) na presença ou ausência de incubação com a protease de WNV.

5.6 Estudo de docking para a protease de WNV

Com o objetivo de verificar de qual maneira os compostos **(10)**, **(11)**, **(12)**, **(15)** e **(19)** se ligam à protease do vírus West Nile, foi conduzido ensaio de docking utilizando o pacote de dados do Schroedinger 2016-2.

Os resultados indicaram que todos os compostos, com exceção do **(19)** utilizaram o grupamento hidroxila para se ligar à regiões próximas aos aminoácidos 59-62 e 75-87 do co-fator NS2B, descritos como fundamentais para a atividade proteolítica da NS2B-NS3[122, 123]. A tabela 1 apresenta as ligações realizados pelos compostos e a figura 13 apresenta os diagramas de interação de cada composto.

Tabela 1: Interação dos compostos (10), (11), (12), (15) e (19) com a protease viral de WNV por estudo de docking

Composto	Ligação			Aminoácido	Aminoácidos de NS2B que foram afetados
	Tipo de Ligação	Descrição	Distância de Ligação		
10	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do composto como doador e carbonila do aminoácido como receptor	2,15	GLU ⁴³ (NS3)	59-61
11	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do composto como doador e oxigênio do grupo éter do aminoácido como receptor	1,68	GLU ¹⁶⁹ (NS3)	79 e 85
11	Ligação de Hidrogênio	Grupo amina do aminoácido como doador e carbonila do composto como receptor	2,17	GLN ¹⁶⁷ (NS3)	
12	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do composto como doador e carbonila do aminoácido como receptor	1,81	GLU ⁸⁶ (NS3)	56, 58-62
12	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do composto como doador e carbonila do aminoácido como receptor	1,88	GLN ⁸⁶ (NS3)	

Composto	Ligação			Aminoácido	Aminoácidos de NS2B que foram afetados
	Tipo de Ligação	Descrição	Distância de Ligação		
15	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do composto como doador e carbonila do aminoácido como receptor	1,97	GLN ¹⁶⁷ (NS3)	
15	Ligação de Hidrogênio	Grupo amina do aminoácido como doador e carbonila do composto como receptor	2,31	GLN ¹⁶⁷ (NS3)	79 e 85
15	Ligação Pi-cation	Entre o anel do grupamento da indan-1,3-diona e o grupo amina do aminoácido	6,54	LYS ⁸⁸ (NS3)	
19	Ligação Pi-Pi stacking	Entre o anel do grupamento da indan-1,3-diona e o grupo amina do aminoácido	5,26	PHE ⁸⁵ (NS2B)	79 e 85

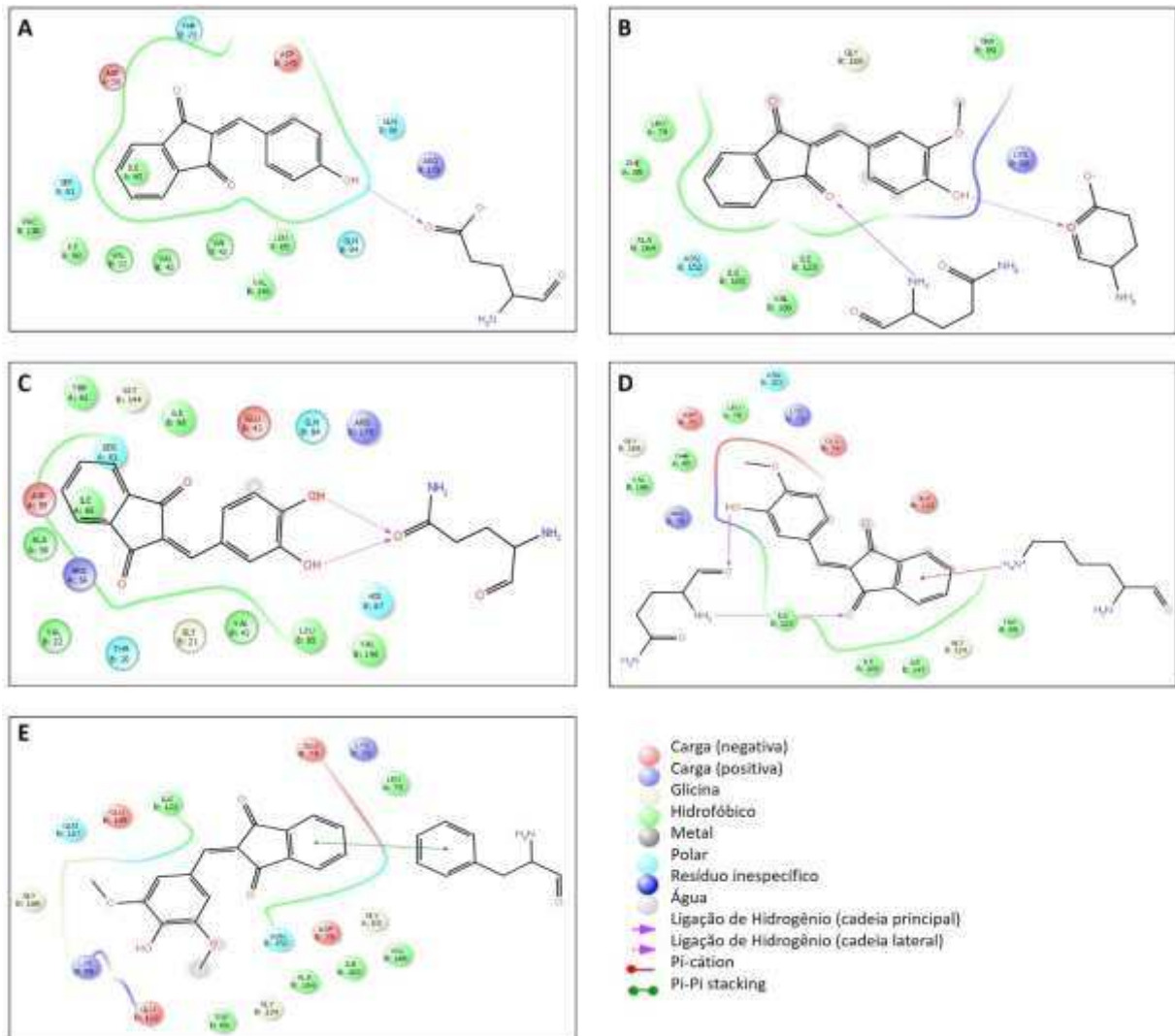


Figura 13: Diagramas de interação dos compostos (10), (11), (12), (15) e (19) com a protease viral de WNV. Cadeia A se refere aos aminoácidos de NS2B e cadeia B se refere aos aminoácidos de NS3. Em **A**, **B**, **C**, **D** e **E** está o diagrama de interação dos compostos **(10)**, **(11)**, **(12)**, **(15)** e **(19)**, respectivamente.

Como pode ser observado através da tabela 1 e da figura 13, os compostos **(10)** e **(12)**, que apresentaram melhores resultados nos ensaios inibitórios, foram os únicos que se ligaram próximo aos aminoácidos 59-62 de NS2B, enquanto que os demais se ligaram próximos aos aminoácidos 75-87 de NS2B. Os estudos de docking também

demonstraram que somente os compostos **(10)** e **(12)** foram capazes de se posicionar de forma que a ligação entre NS2B e NS3 fosse bloqueada como pode ser observado na figura 14.

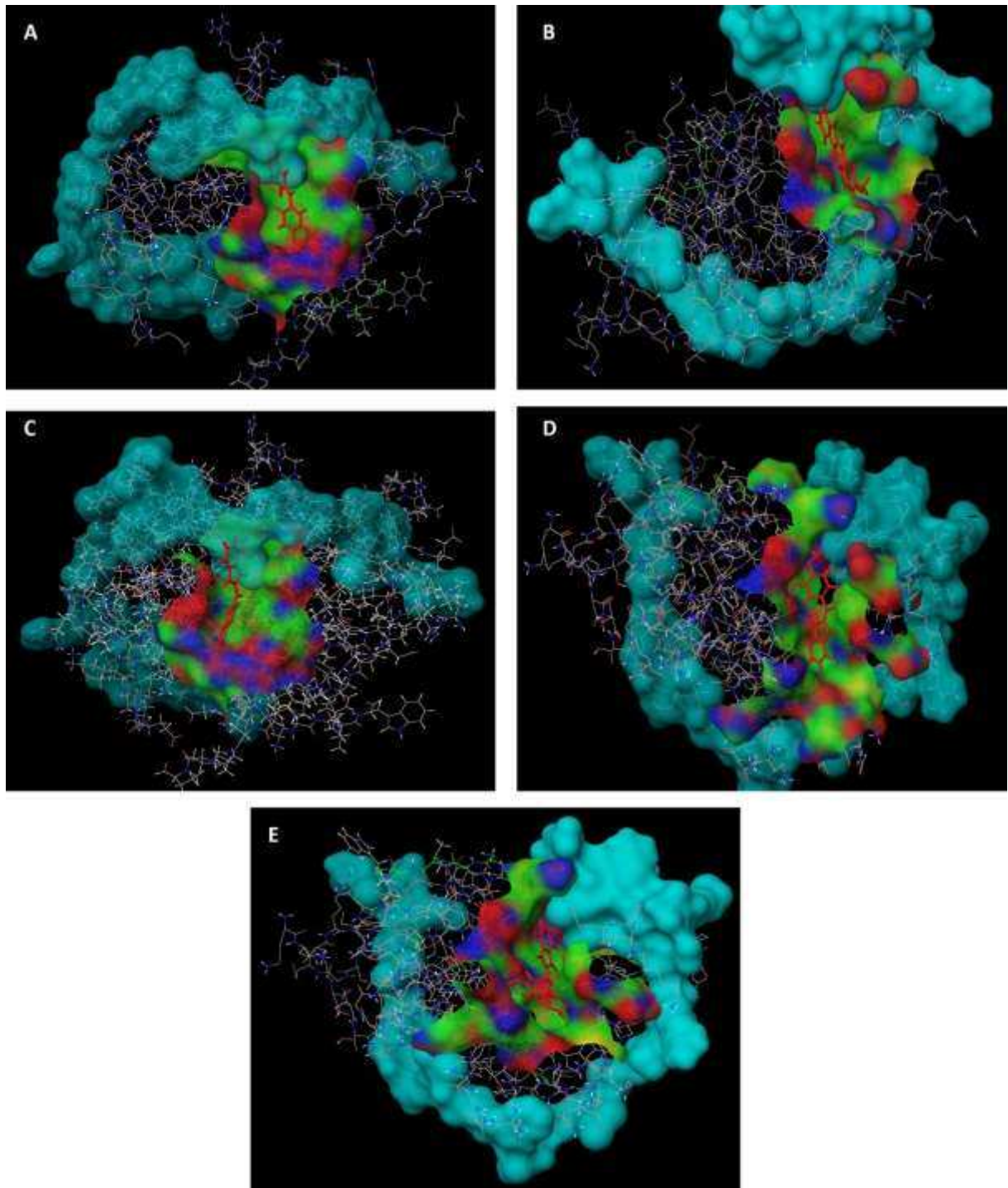


Figura 14: Estudo de docking dos compostos (10), (11), (12), (15) e (19) com a protease viral de WNV. Em A, B, C, D e E está o estudo de docking dos compostos (10), (11), (12), (15) e (19), respectivamente. Em azul está a superfície de NS2B; colorido está a superfície de interação dos compostos com NS3; as linhas representam o restante dos resíduos de NS3 que não participam da superfície de interação dos compostos.

5.7 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi conduzido utilizando 7 concentrações diferentes dos compostos (10) e (12). A avaliação da citotoxicidade dos compostos teste selecionados foi realizada sobre células VERO, utilizando ensaio colorimétrico do MTT.

O valor da concentração dos compostos testes que reduziu em 50% o metabolismo celular (CC_{50}) foi obtido por regressão não-linear e correspondeu a 89,72 μM e 267,60 μM respectivamente para (10) e (12) (Figura 15).

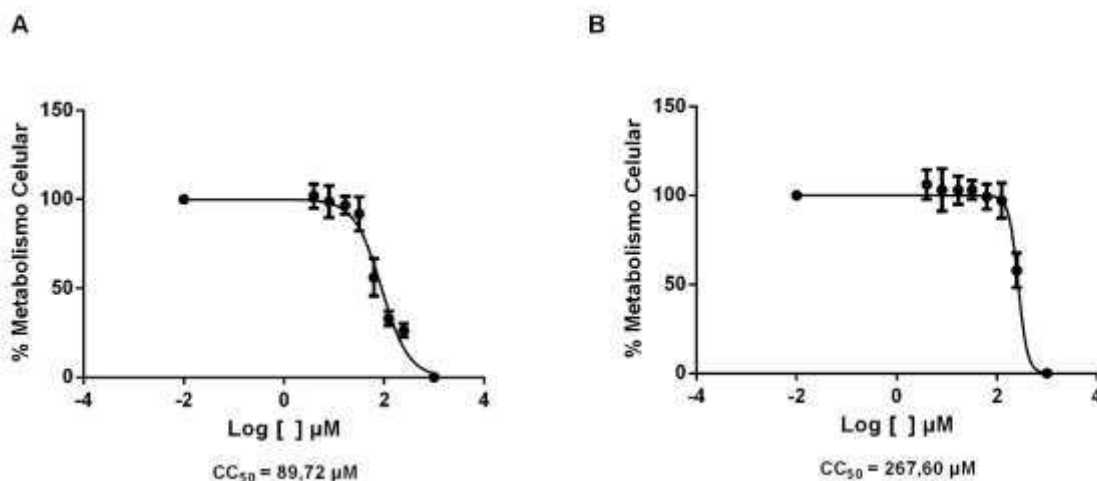


Figura 15: Ensaio de citotoxicidade para os compostos (10) e (12) em células Vero. Em A está o metabolismo celular para o composto (10) e em B está o

metabolismo celular para o composto **(12)**. O cálculo da regressão teve como base o coeficiente de Hill. O valor do R^2 foi de 0,95 e 0,94 para **(10)** e **(12)**, respectivamente.

5.8 Ensaio Virucida para os vírus Dengue DENV-1-4 e ZIKV

O ensaio virucida foi conduzido mediante prévia incubação do vírus com o composto. Após a incubação, a solução vírus-composto foi adicionada à célula por um período para que fosse possível a adsorção e internalização viral. Posteriormente, a solução foi substituída por CMC e foi verificado o desenvolvimento de placas de lise sobre células VERO.

Esse ensaio foi conduzido com concentrações diferentes dos compostos **(10)** e **(12)** (3, 6, 12, 25, 50 e 100 μM) contra os vírus DENV-1-4 e ZIKV e os resultados estão apresentados na Figura 16. O valor da concentração dos compostos teste que inibiu 50% da infecção viral (EC_{50}) foi obtido por regressão não-linear, levando ao cálculo do Índice de Seletividade (IS). Esses valores estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de CC_{50} , EC_{50} e IS dos compostos (10) e (12) na presença dos vírus DENV1-4 e ZIKV

Composto	CC_{50} μM	DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4		ZIKV	
		EC_{50} μM	IS	EC_{50} μM	IS	EC_{50} μM	IS	EC_{50} μM	IS	EC_{50} μM	IS
10	89,72	46,57	2	39,19	2	21,00	4	55,85	2	62,78	1
12	267,60	7,97	34	20,40	13	1,82	147	29,87	9	18,30	15

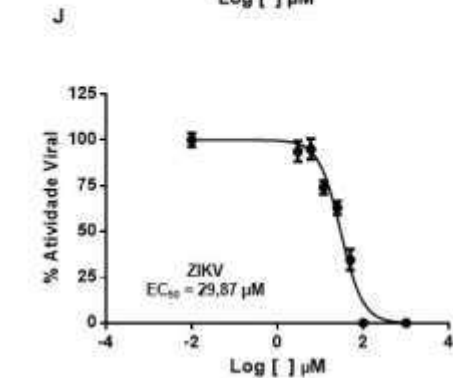
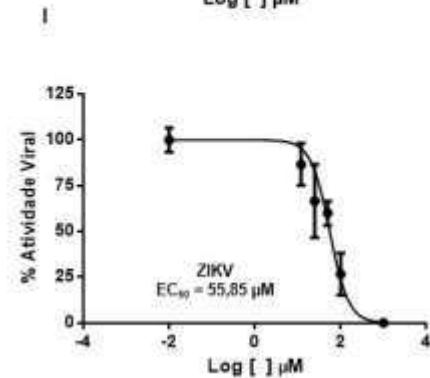
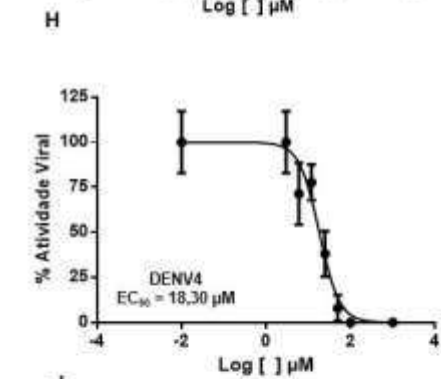
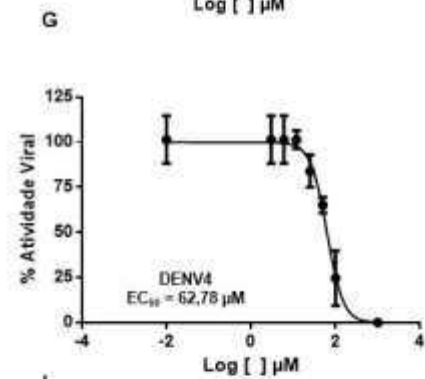
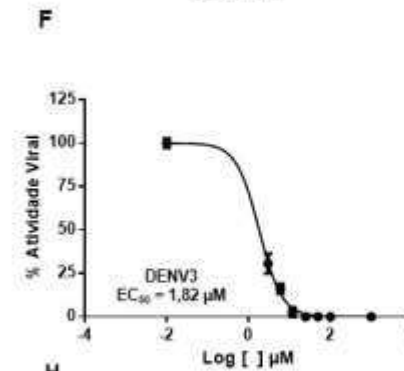
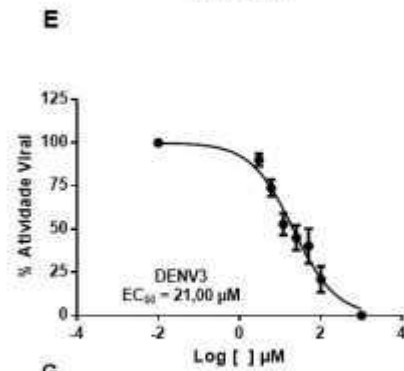
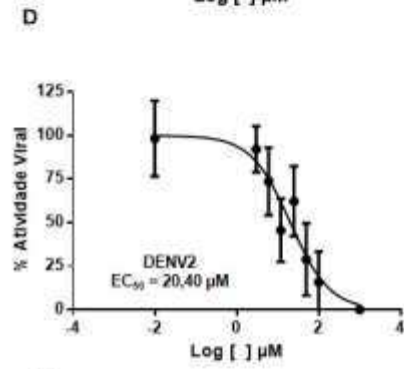
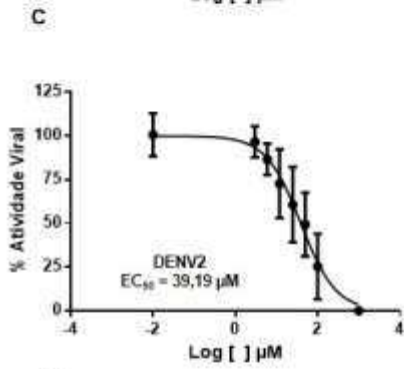
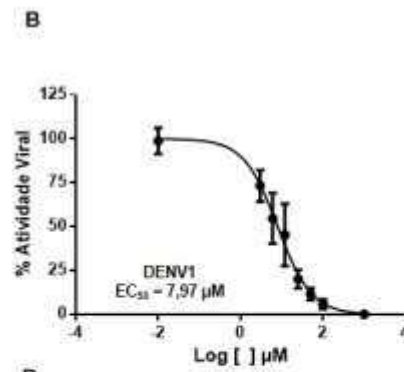
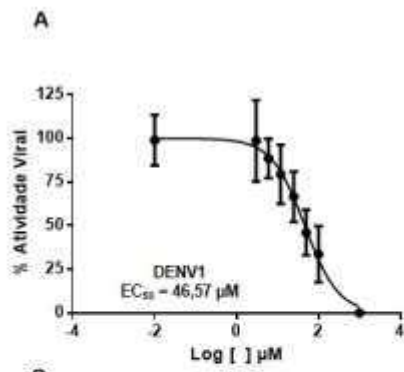


Figura 16: Ensaio antiviral para os compostos (10) e (12) em células Vero. Em **A** e **B** está a atividade antiviral contra DENV1 para **(10)** e **(12)** respectivamente; em **C** e **D** está a atividade antiviral contra DENV2 para **(10)** e **(12)** respectivamente; em **E** e **F** está a atividade antiviral contra DENV3 para **(10)** e **(12)** respectivamente; em **G** e **H** está a atividade antiviral contra DENV4 para **(10)** e **(12)** respectivamente; e em **I** e **J** está a atividade antiviral contra ZIKV para **(10)** e **(12)** respectivamente. O cálculo da regressão teve como base o coeficiente de Hill. Para todos os gráficos o valor do R^2 foi maior que 0,90.

5.9 Ensaio de pré-tratamento para os vírus DENV-2 e ZIKV

A proteção encontrada no ensaio virucida sugere dois mecanismos de ação: a) o composto atua diretamente sobre a partícula viral; ou b) o composto atua sobre os receptores celulares impedindo a entrada do vírus na célula. Para elucidar quais dos dois mecanismos, foi realizado ensaio de pré-tratamento, onde as células são previamente tratadas com o composto. Um resultado de proteção nesse ensaio indica que o composto atua diretamente sobre a superfície celular e não sobre a partícula viral.

O ensaio de pré-tratamento foi conduzido com concentrações diferentes dos compostos **(10)** e **(12)** (3, 6, 12, 25, 50 e 100 μM) contra os vírus DENV-2 e ZIKV, através de ensaio colorimétrico do MTT sobre células VERO. Os resultados não indicaram diferença significativa na infecção viral celular na presença ou ausência dos compostos **(10)** e **(12)**, como pode ser visualizado na figura 17.

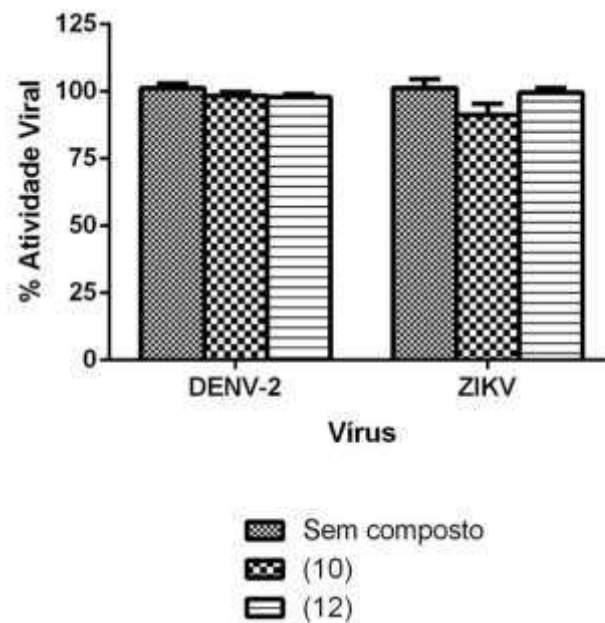


Figura 17: Ensaio antiviral de pré-tratamento para os compostos (10) e (12) à 100 μ M em células Vero para os vírus DENV-2 e ZIKV.

5.10 Ensaio de pós-tratamento para os vírus DENV-2 e ZIKV

Compostos antivirais podem atuar nas fases de replicação viral. Nesse caso, a partícula viral é adsorvida e internalizada, mas quando o seu ciclo replicativo é iniciado, o inibidor impede que ele ocorra, geralmente por ação sobre as proteínas do capsídeo ou sobre as enzimas virais. Para verificar se o composto atua nas fases de replicação, é realizado o ensaio de pós-tratamento. Neste ensaio, o composto é adicionado somente após a partícula viral ser adsorvida e internalizada nas células. Um resultado de proteção nesse ensaio indica que o composto atua nas fases de replicação.

O ensaio de pós-tratamento foi conduzido com concentrações diferentes dos compostos **(10)** e **(12)** (3, 6, 12, 25, 50 e 100 μ M) contra os vírus DENV-2 e ZIKV, através de ensaio colorimétrico do MTT sobre células VERO e está apresentado na

Figura 18. Os resultados não indicaram diferença significativa na replicação viral na presença ou ausência dos compostos **(10)** e **(12)**.

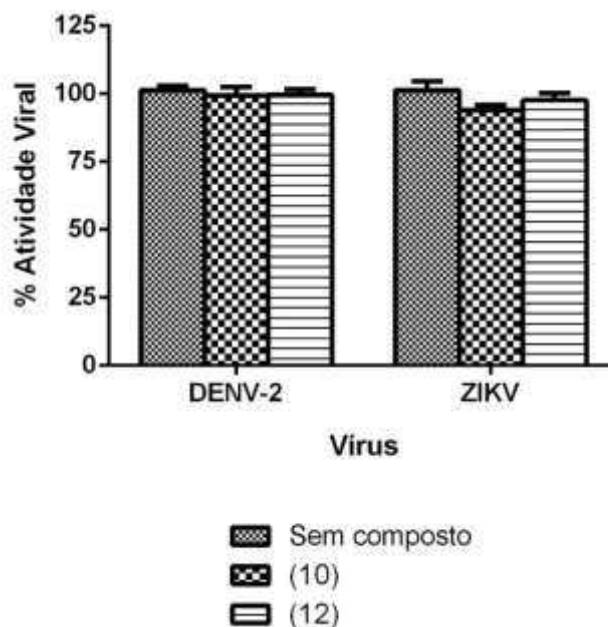


Figura 17: Ensaio antiviral de pós-tratamento para os compostos (10) e (12) à 100 μ M em células Vero para os vírus DENV-2 e ZIKV.

5.11 Estudo de docking para a proteína E do DENV-2 e ZIKV

A proteção encontrada no ensaio virucida associada à ausência de proteção nos ensaios de pré e pós-tratamento indicam que os compostos atuam diretamente sobre a partícula viral. Para tentar elucidar o mecanismo de ação desses compostos sobre os vírus, foi conduzido ensaio de docking com a proteína E do DENV-2 e ZIKV.

Este ensaio foi realizado utilizando o pacote de dados do Schrodinger 2016-2. Os compostos **(10)** e **(12)** se ligaram à proteína E do vírus DENV-2 em um pocket anteriormente descrito[63] que corresponde aos aminoácidos 61, 125, 204, 206, 257-258, 260-262, 269 da cadeia A, e 63-65, 237, 239, 251-256 da cadeia B da proteína E do DENV-2. Trata-se de uma região de estabilização do dímero da proteína E. Para

a proteína E do vírus ZIKV os compostos **(10)** e **(12)** se ligaram à região de junção dos monômeros dessa proteína, que corresponde aos aminoácidos 258-270 e que foi anteriormente descrita[57]. A tabela 3 apresenta as ligações realizados pelos compostos e a figura 18 apresenta os diagramas de interação de cada composto.

Tabela 3: Interação dos compostos (10) e (12) com a proteína E do DENV-2 e ZIKV por estudo de docking

Composto	Proteína E	Ligação			
		Tipo de Ligação	Descrição	Distância de Ligação	
10	DENV-2	Ligação de Hidrogênio	Carbonila do composto como doador e hidroxila do aminoácido como receptor	2,67	THR ²⁶²
12	DENV-2	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do aminoácido como doador e carbonila do composto como receptor	2,01	THR ²⁶²
12	DENV-2	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do composto como doador e carbonila do aminoácido como receptor	2,24	THR ²³⁶
10	ZIKV	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do aminoácido como doador e hidroxila do composto como receptor	1,98	THR ²⁶⁷
10	ZIKV	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do composto como doador e carbonila do aminoácido como receptor	1,82	GLN ²⁶¹
12	ZIKV	Ligação de Hidrogênio	Hidroxila do aminoácido como doador e carbonila do composto como receptor	1,83	THR ²⁶⁷

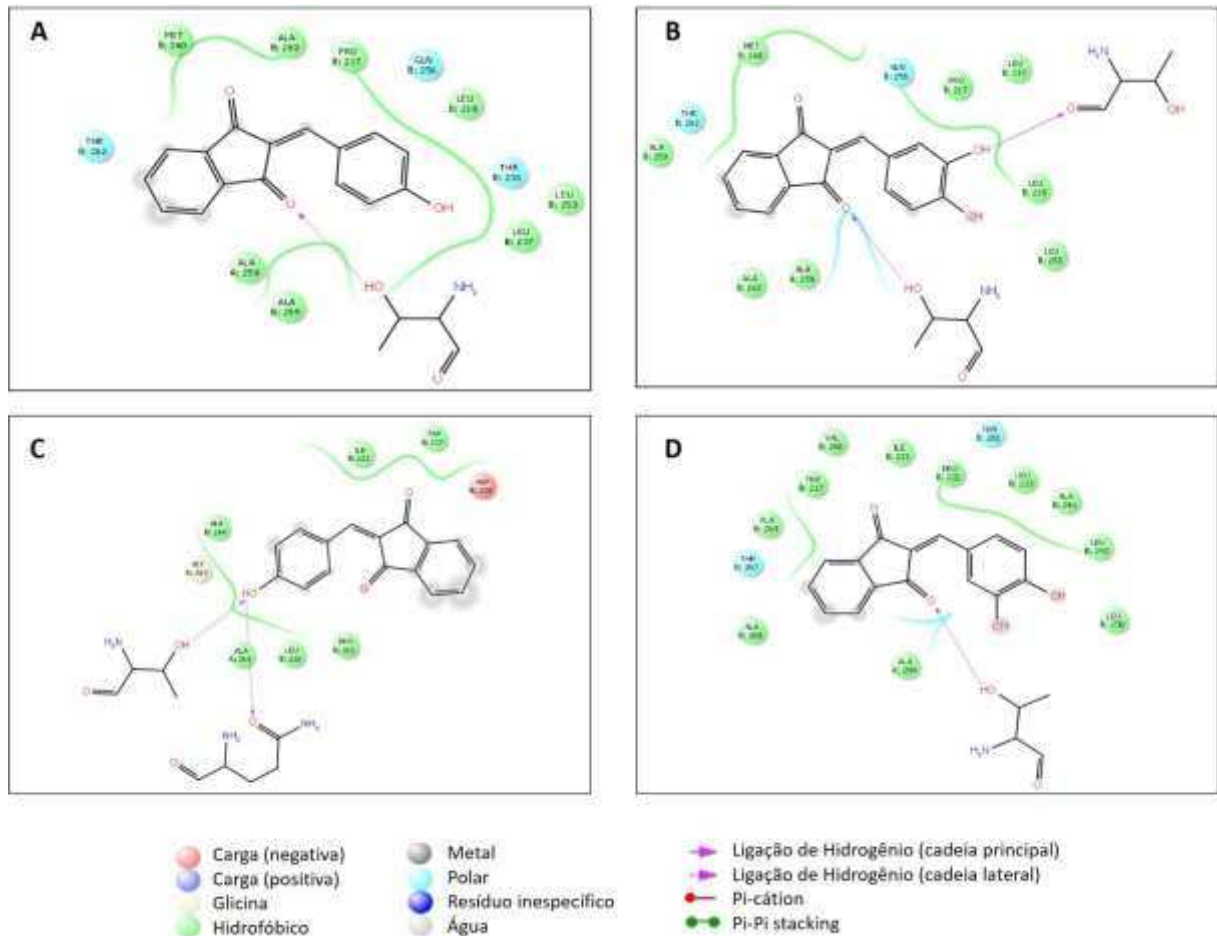


Figura 18: Diagramas de interação dos compostos (10) e (19) com a proteína E dos vírus DENV-2 e ZIKV. Cadeia A e B se referem à cada um dos monômeros do dímero de proteína E. Em **A** e **B** está o diagrama de interação dos compostos (10) e (12), respectivamente, para a proteína E do DENV-2. Em **C** e **D** está o diagrama de interação dos compostos (10) e (12), respectivamente, para a proteína E de ZIKV.

Como pode ser observado através da tabela 3 e da figura 18, os grupamentos hidroxila e carbonila dos compostos desempenharam papel importante na ligação dos compostos às regiões de estabilização dos dímeros de proteína E do DENV-2 e ZIKV. A figura 19 apresenta a posição de ligação dos compostos.

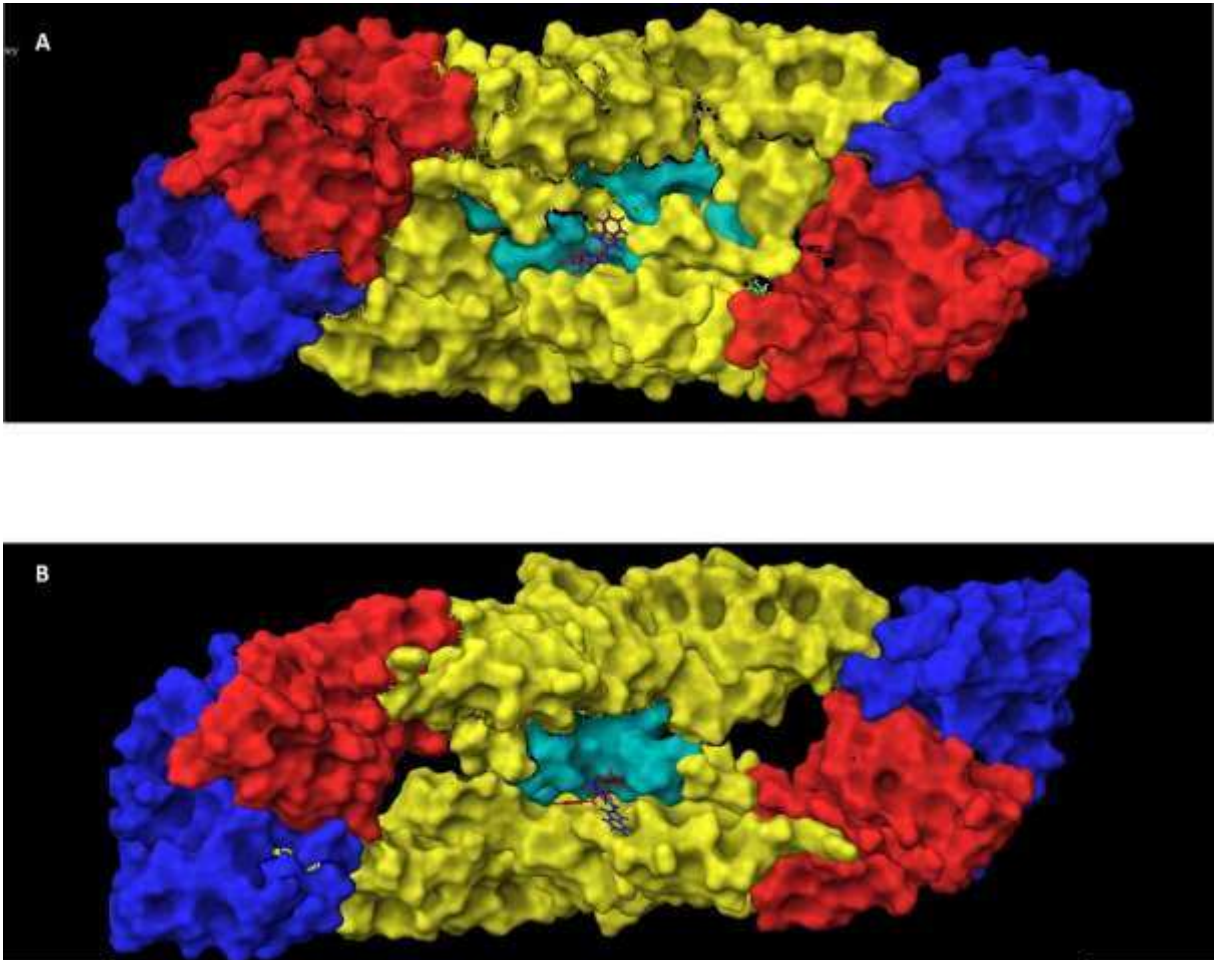


Figura 19: Estudo de docking dos compostos (10) e (12) com a proteína E do DENV-2 e ZIKV. Domínio I está mostrado em vermelho; domínio II em amarelo; domínio III em azul; a região de interação dos monômeros da proteína E em ciano; o composto (10) está em azul e o (12) em vermelho. Em **A** os compostos (10) e (12) no pocket de estabilização central do dímero da proteína E do DENV-2; Em **B** os compostos (10) e (12) no pocket de estabilização central do dímero da proteína E de ZIKV.

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foram encontrados dois compostos derivados da indan-1,3-diona, promissores em inibir a protease do Vírus WNV. O composto **(10)** apresentou cerca de 41% de inibição, e **(12)** apresentou 100% de inibição na concentração de 16,6 μM .

Vários trabalhos indicam a ação de derivados da indan-1,3-diona contra o Papilomavírus Humano (HPV)[110, 112, 113]. Pesquisadores ligados à companhia Boehringer Ingelheim relataram diversos derivados de indan-1,3-dionas com valores de IC₅₀ inferiores a 1 μM : 0,35 μM [113], 0,61 μM [112] e 0,028 μM [110].

Destaca-se atividade de inibição enzimática viral para indan-1,3-diona, como foi tratado por Artico e colaboradores, onde derivados inibiram a enzima integrase do vírus HIV-1, com IC₅₀ de $3 \pm 0,5 \mu\text{M}$ [111]. Liu e colaboradores testaram derivados da indan-1,3-diona contra HCV, que também integra a família Flaviridae como WNV e DENV. Foram encontrados quatro compostos eficientes, capazes de inibir a protease do vírus HCV com valores de IC₅₀ de 12; 3,6; 3,1 e 1,7 μM [108]. Esses valores de IC₅₀ são próximos do que foi encontrado neste trabalho, 3,19 μM para o **(12)** e 11,27 μM para o **(10)**. Nos resultados encontrados por Liu e colaboradores[108], algumas das indandionas apresentaram variação na inibição dependente do tempo, enquanto que para outras a inibição foi estabelecida imediatamente. Neste trabalho a inibição não foi tempo-dependente, houve resposta imediata e constante de inibição. Comparando ainda com os resultados de Liu e colaboradores, as moléculas que apresentavam grupos hidroxila não obtiveram resposta tempo-dependente. Neste trabalho os grupos aromáticos da porção alquilideno dos compostos inibitórios **(10)**, **(11)**, **(12)**, **(15)** e **(19)** apresentam hidroxilas, o que fortalece a hipótese de que elas são importantes para inibir de forma não tempo-dependente a protease dos vírus pertencentes à família Flaviviridae.

Quando se avaliou a semelhança estrutural entre as moléculas que apresentaram comportamento inibitório, observou-se que toda a série com um grupo hidroxila nas posições para ou meta do anel aromático foram capazes de inibir em alguma medida a protease viral. Trabalhos anteriores com a protease do HIV demonstraram importante papel de grupos hidroxila na inibição desse vírus. Os inibidores eficientes da protease do HIV apresentavam um grupo hidroxila que substituía a molécula de água catalítica no sítio-ativo. Esse grupo fazia ligação de hidrogênio com os resíduos de aspartato cataliticamente ativos[124].

Tomlinson e Watowich demonstraram a participação do grupo hidroxila na inibição da protease do DENV. Interações significativas ocorreram entre grupos hidroxila dos inibidores com resíduos conservados que constituíam a tríade catalítica (His⁵¹, Asp⁷⁵, Ser¹³⁵) da protease[125]. Os estudos de docking com a protease de WNV demonstraram a participação das hidroxilas dos compostos **(10)**, **(11)**, **(12)** e **(15)** na ligação à protease viral. Os compostos **(10)** e **(12)** encaixaram-se em uma região de interação entre NS2B e NS3, tendo como área de interação os aminoácidos 59-62 deste co-fator descritos por Chappell e colaboradores[122] como críticos para a atividade proteolítica de NS3 de WNV. Já os compostos **(11)**, **(15)** e **(19)** também se ligaram à uma região importante descrita pela equipe de Chappell, próximos aos aminoácidos 75-87 do co-fator, resultado semelhante foi encontrado anteriormente por Johnston e colaboradores na identificação de um inibidor para a protease de WNV [123]. Os resultados obtidos indicam que as poses de ligação dos compostos **(10)** e **(12)**, entre NS2B e NS3, afetou a interação entre essas proteínas e reduziu consideravelmente a atividade proteolítica da enzima.

Os resultados dos estudos de docking confirmam ainda os resultados obtidos nos ensaios de cinética enzimática, demonstrando um perfil de inibição não

competitivo[126], onde o inibidor e o substrato podem se ligar simultaneamente a uma molécula de enzima; tanto **(10)** quanto **(12)** reduziram a velocidade máxima sem alteração do K_M , com valores de K_i de 12,31 e 1,25 μM para **(10)** e **(12)**, respectivamente. Isso reforça as evidências de que o pocket onde se ligou os compostos **(10)** e **(12)** é um sítio alostérico, provavelmente afetando a interação produtiva entre o co-fator e a protease. Outros trabalhos com a protease do DENV identificaram inibidores não competitivos que se ligaram a sítio alostérico[127, 128].

Wu e colaboradores identificaram compostos derivados de benzotiazol que foram capazes de inibir a protease do DENV-2 e 3 in vitro e em células com valores de IC_{50} reduzidos; um composto apresentou valor de 4,2 e 1 μM e outro de 3,6 e 9,1 μM para as proteases do DENV-2 e DENV-3, respectivamente. Ambos compostos reduziram o valor de V_{MAX} sem alterar K_M , indicando um mecanismo de inibição não competitivo, provavelmente associado à ligação do inibidor em sítio alostérico[127]. Sousa e colaboradores também identificaram inibidores não competitivos derivados de flavonoides para a protease do DENV-2 e 3 com valores de IC_{50} variando 15 a 40 μM . Estudos de docking também indicaram ligação dos compostos em sítio alostérico [128]. Outro trabalho realizou triagem in silico de compostos para a protease do DENV-2 com resultado confirmado in vitro por ensaio enzimático e identificou quatro inibidores não competitivos, com valor de k_i variando entre 69 a 410 μM [129]. Othaman e colaboradores também realizaram triagem por docking para a protease do DENV-2 identificando potenciais inibidores não competitivos que apresentaram reduzidos valores de k_i [130]. Sidique e colaboradores planejaram, sintetizaram e avaliaram in vitro derivados de pirazol que foram eficientes e estáveis inibidores alostéricos da protease de WNV com valores de IC_{50} de 13,8 e 16,0 μM [131].

Os ensaios de citotoxicidade indicaram valores de CC₅₀ de 89,72 e 267,60 µM para **(10)** e **(12)** respectivamente. Esses valores, quando associados aos de EC₅₀ obtidos para DENV e ZIKV, resultaram em elevados valores de IS para o composto **(12)**, o que não foi observado para **(10)**. Esse resultado indica o potencial inibitório de **(12)** não só para a protease de WNV, como também para os vírus DENV e ZIKV, para os quais obteve-se bons valores de IS, com destaque para o vírus DENV-3, com IS de 147.

A proteção identificada no ensaio virucida somada à ausência de proteção nos ensaios de pré e pós-tratamento com DENV e ZIKV indicaram que os compostos **(10)** e **(12)** provavelmente atuam diretamente sobre o vírus. Quando a partícula viral se encontra madura e, portanto, capaz de infectar a célula, sua superfície é revestida por dímeros da proteína E, que estão associados com a entrada do vírus na célula e sua fusão à membrana do endossomo. Logo, uma molécula que atue diretamente sobre a partícula viral, provavelmente está atuando sobre os dímeros da proteína E, o que acaba por impedir a adsorção viral ou a fusão das membranas virais e do hospedeiro. Os ensaios de docking realizados com os compostos **(10)** e **(12)** com as proteínas E do DENV-2 e ZIKV indicaram que, para ambas as proteínas, os compostos foram capazes de se ligar a uma região de estabilização do dímero E.

A região à qual se ligaram os compostos **(10)** e **(12)** na proteína E do DENV-2 é uma região descrita como um importante alvo para desenvolvimento de fármacos antivirais. Esse pocket é formado pelos aminoácidos 61, 125, 204, 206, 257-258, 260-262, 269 da cadeia A, e 63-65, 237, 239, 251-256 da cadeia B e participa da estabilização dos dímeros da proteína E, sendo portanto um alvo promissor.[63]. Esse achado é relevante, já que a maioria dos antivirais descritos para a proteína E ligam-se ao sítio hidrofóbico β-OG[59].

Já para ZIKV, a região a qual os compostos se ligaram também corresponde a uma região de estabilização do dímero E descrita por Dai e colaboradores [57] e como para DENV-2, pode ser um importante alvo para o desenvolvimento de fármacos antivirais.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos durante o presente estudo, podemos concluir que:

- Os compostos **(10)** e **(12)** foram os melhores candidatos antivirais para a protease de WNV identificados neste trabalho. Ambos atuam como inibidores não-competitivos, ligam-se à sítio alostérico, com importante participação das hidroxilas presentes na molécula **(12)**.
- O composto **(12)** apresentou excelentes valores de Índice de Seletividade para os vírus DENV-1-4 e ZIKV, com alto valor de CC_{50} e reduzidos valores de EC_{50} . Resultado semelhante não foi encontrado para **(10)**.
- Os compostos **(10)** e **(12)** atuam inibindo diretamente a partícula viral, provavelmente por ligação à região de estabilidade do dímero de proteína E presente nos vírus avaliados.
- O composto **(12)**, sendo uma molécula obtida por um novo e mais eficiente processo sintético, é um protótipo promissor e sua avaliação e aprimoramento devem ser continuados.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho encorajam a realização de testes pré-clínicos para verificar a toxicidade e a inibição viral dos compostos in vivo. Esses ensaios serão importantes não só para dar continuidade à pesquisa clínica como também para elucidar a possível ação desses compostos como anticoagulantes. Outros derivados de indan-1,3-dionas disponíveis no mercado farmacêutico como anisindiona, fenindiona e difenadiona apresentam ação anticoagulante, mas com estrutura química diferente dos derivados aqui utilizados. Como pequenas alterações estruturais na molécula podem modificar seu mecanismo de ação, os estudos in vivo esclarecerão se os compostos identificados poderão prejudicar os sintomas das doenças causadas pelos Flavivirus avaliados.

9. REFERÊNCIAS

1. B.D. Lindenbach, H.J.T., C.M. Rice, *Flaviviridae: the Viruses and their Replication*. 2007, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
2. (WHO), W.H.O., *Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020*. 2012, WHO Press: Geneva.
3. Messina, J.P., et al., Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*, 2014. **22**(3): p. 138-46.
4. Holmes, E.C., *Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases*. *Br Med Bull*, 1998. **54**(3): p. 533-43.
5. Brady, O.J., et al., Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. **6**(8): p. e1760.
6. Sessions, O.M., et al., Exploring the origin and potential for spread of the 2013 dengue outbreak in Luanda, Angola. *Glob Health Action*, 2013. **6**: p. 21822.
7. Amarasinghe, A., et al., Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis*, 2011. **17**(8): p. 1349-54.
8. Yacoub, S., J. Mongkolsapaya, and G. Screaton, Recent advances in understanding dengue. *F1000Res*, 2016. **5**.
9. Brasil, *Boletim Epidemiológico*. 2016, Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília. p. 1-10.
10. Costa, S.M., et al., DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its

- correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*, 2007. **358**(2): p. 413-23.
11. Whitehead, S.S., et al., Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(7): p. 518-28.
 12. Paupy, C., et al., *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect*, 2009. **11**(14-15): p. 1177-85.
 13. Oliveira, A.S., et al., NS3 and NS5 proteins: important targets for anti-dengue drug design. *J. Braz. Chem. Soc*, 2014. **25**(10): p. 1759-1769.
 14. Balanca, G., et al., Low West Nile virus circulation in wild birds in an area of recurring outbreaks in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2009. **9**(6): p. 737-41.
 15. Bernkopf, H., S. Levine, and R. Nerson, Isolation of West Nile virus in Israel. *J Infect Dis*, 1953. **93**(3): p. 207-18.
 16. Bondre, V.P., et al., West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol*, 2007. **88**(Pt 3): p. 875-84.
 17. Flatau, E., et al., West Nile fever encephalitis. *Isr J Med Sci*, 1981. **17**(11): p. 1057-9.
 18. S. George, M.G.-D., J. A. Rao, S. R. Prasad, and K. M. Pavri, Isolation of West Nile virus from the brains of children who had died of encephalitis. *Bulletin of the World Health Organization*, 1984. **62**(6): p. 879-882.
 19. Goldblum, N., V.V. Sterk, and B. Paderski, West Nile fever; the clinical features of the disease and the isolation of West Nile virus from the blood of nine human cases. *Am J Hyg*, 1954. **59**(1): p. 89-103.

20. Goldblum, N., et al., The natural history of West Nile Fever. I. Clinical observations during an epidemic in Israel. *Am J Hyg*, 1956. **64**(3): p. 259-69.
21. Jupp, P.G., The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **951**: p. 143-52.
22. Murgue, B., et al., West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **951**: p. 117-26.
23. Smithburn, K.C., et al., A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1940. **20**: p. 471-472.
24. Spigland, I., et al., [Clinical and laboratory observations in an outbreak of West Nile fever in Israel in 1957]. *Harefuah*, 1958. **54**(11): p. 275-80; English & French abstracts 280-1.
25. Pruzanski, W. and R. Altman, Encephalitis due to West Nile fever virus. *World Neurol*, 1962. **3**: p. 524-8.
26. Platonov, A.E., et al., Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis*, 2001. **7**(1): p. 128-32.
27. Tsai, T.F., et al., West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*, 1998. **352**(9130): p. 767-71.
28. Weinberger, M., et al., West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis*, 2001. **7**(4): p. 686-91.
29. Morales, M.A., et al., West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis*, 2006. **12**(10): p. 1559-61.

30. Monge Maillo, B., et al., Importation of West Nile virus infection from Nicaragua to Spain. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(7): p. 1171-3.
31. Gould, L.H. and E. Fikrig, West Nile virus: a growing concern? *J Clin Invest*, 2004. **113**(8): p. 1102-7.
32. Ometto, T., et al., West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2013. **107**(11): p. 723-30.
33. Bakonyi, T., et al., Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(2): p. 225-31.
34. Berthet, F.X., et al., Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol*, 1997. **78 (Pt 9)**: p. 2293-7.
35. Van der Meulen, K.M., M.B. Pensaert, and H.J. Nauwynck, West Nile virus in the vertebrate world. *Arch Virol*, 2005. **150**(4): p. 637-57.
36. Petersen, L.R., A.C. Brault, and R.S. Nasci, West Nile virus: review of the literature. *JAMA*, 2013. **310**(3): p. 308-15.
37. Bode, A.V., et al., West Nile virus disease: a descriptive study of 228 patients hospitalized in a 4-county region of Colorado in 2003. *Clin Infect Dis*, 2006. **42**(9): p. 1234-40.
38. Carson, P.J., et al., Neuroinvasive disease and West Nile virus infection, North Dakota, USA, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*, 2012. **18**(4): p. 684-6.
39. Danis, K., et al., Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg Infect Dis*, 2011. **17**(10): p. 1868-72.

40. Valentine, G., L. Marquez, and M. Pammi, Zika virus epidemic: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2016.
41. Goebel, S., et al., A sensitive virus yield assay for evaluation of Antivirals against Zika Virus. *J Virol Methods*, 2016. **238**: p. 13-20.
42. Campos, G.S., A.C. Bandeira, and S.I. Sardi, Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2015. **21**(10): p. 1885-6.
43. Musso, D., Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2015. **21**(10): p. 1887.
44. Brasil, Boletim Epidemiológico. 2017, Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília. p. 1-10.
45. Enfissi, A., et al., Zika virus genome from the Americas. *Lancet*, 2016. **387**(10015): p. 227-8.
46. Hamel, R., et al., Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes Infect*, 2016. **18**(7-8): p. 441-9.
47. Musso, D., et al., Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*, 2015. **21**(2): p. 359-61.
48. Oehler, E., et al., Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*, 2014. **19**(9).
49. Abushouk, A.I., A. Negida, and H. Ahmed, An updated review of Zika virus. *J Clin Virol*, 2016. **84**: p. 53-58.
50. De Araújo, J.S.S., et al., Microcephaly in northeastern Brazil: a review of 16 208 births between 2012 and 2015. 2016, Bull World Health Organ: Geneva.

51. Schuler-Faccini, L., et al., Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. 2016, CDC: Atlanta. p. 59-62.
52. Plourde, A.R. and E.M. Bloch, A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis*, 2016. **22**(7): p. 1185-92.
53. Shan, C., et al., Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine. *ACS Infect Dis*, 2016. **2**(3): p. 170-2.
54. Noble, C.G., et al., Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral Res*, 2010. **85**(3): p. 450-62.
55. Hidari, K.I. and T. Suzuki, Dengue virus receptor. *Trop Med Health*, 2011. **39**(4 Suppl): p. 37-43.
56. Kuhn, R.J., et al., Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 2002. **108**(5): p. 717-25.
57. Dai, L., et al., Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe*, 2016. **19**(5): p. 696-704.
58. Modis, Y., et al., Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 2004. **427**(6972): p. 313-9.
59. Modis, Y., et al., A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(12): p. 6986-91.
60. Poh, M.K., et al., A small molecule fusion inhibitor of dengue virus. *Antiviral Res*, 2009. **84**(3): p. 260-6.

61. Wang, Q.Y., et al., A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(5): p. 1823-31.
62. Kampmann, T., et al., In silico screening of small molecule libraries using the dengue virus envelope E protein has identified compounds with antiviral activity against multiple flaviviruses. *Antiviral Res*, 2009. **84**(3): p. 234-41.
63. Fuzo, C.A. and L. Degreve, New pockets in dengue virus 2 surface identified by molecular dynamics simulation. *J Mol Model*, 2013. **19**(3): p. 1369-77.
64. Dong, H., et al., Flavivirus RNA methylation. *J Gen Virol*, 2014. **95**(Pt 4): p. 763-78.
65. Murray, C.L., C.T. Jones, and C.M. Rice, Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(9): p. 699-708.
66. Tay, M.Y., et al., The C-terminal 50 amino acid residues of dengue NS3 protein are important for NS3-NS5 interaction and viral replication. *J Biol Chem*, 2015. **290**(4): p. 2379-94.
67. Lim, S.P., et al., Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Res*, 2013. **100**(2): p. 500-19.
68. Xu, T., et al., Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *J Virol*, 2005. **79**(16): p. 10278-88.
69. Kapoor, M., et al., Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem*, 1995. **270**(32): p. 19100-6.

70. Johansson, M., et al., A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 4): p. 735-45.
71. Egloff, M.P., et al., An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J*, 2002. **21**(11): p. 2757-68.
72. Falgout, B., et al., Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*, 1991. **65**(5): p. 2467-75.
73. Teo, K.F. and P.J. Wright, Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *J Gen Virol*, 1997. **78 (Pt 2)**: p. 337-41.
74. Assenberg, R., et al., Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol*, 2009. **83**(24): p. 12895-906.
75. Chambers, T.J., et al., Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, 1990. **44**: p. 649-88.
76. Nall, T.A., et al., Enzymatic characterization and homology model of a catalytically active recombinant West Nile virus NS3 protease. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 48535-42.
77. Lei, J., et al., Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science*, 2016. **353**(6298): p. 503-5.
78. Chambers, T.J., et al., Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-

- specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(22): p. 8898-902.
79. Rothan, H.A., et al., Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1. *BMC Infect Dis*, 2012. **12**: p. 314.
 80. Bastos Lima, A., et al., Dual inhibitors of the dengue and West Nile virus NS2B-NS3 proteases: Synthesis, biological evaluation and docking studies of novel peptide-hybrids. *Bioorg Med Chem*, 2015. **23**(17): p. 5748-55.
 81. Hammamy, M.Z., et al., Development and characterization of new peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B-NS3 protease. *ChemMedChem*, 2013. **8**(2): p. 231-41.
 82. Behnam, M.A., et al., The Medicinal Chemistry of Dengue Virus. *J Med Chem*, 2016. **59**(12): p. 5622-49.
 83. Timiri, A.K., B.N. Sinha, and V. Jayaprakash, Progress and prospects on DENV protease inhibitors. *Eur J Med Chem*, 2016. **117**: p. 125-43.
 84. Weigel, L.F., et al., Phenylalanine and Phenylglycine Analogues as Arginine Mimetics in Dengue Protease Inhibitors. *J Med Chem*, 2015. **58**(19): p. 7719-33.
 85. Gruba, N., et al., Substrate profiling of Zika virus NS2B-NS3 protease. *FEBS Lett*, 2016. **590**(20): p. 3459-3468.
 86. Lescar, J., et al., Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res*, 2008. **80**(2): p. 94-101.

87. Luo, D., S.G. Vasudevan, and J. Lescar, The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res*, 2015. **118**: p. 148-58.
88. Chiang, P.Y. and H.N. Wu, The role of surface basic amino acids of dengue virus NS3 helicase in viral RNA replication and enzyme activities. *FEBS Lett*, 2016. **590**(14): p. 2307-20.
89. Noble, C.G. and P.Y. Shi, Structural biology of dengue virus enzymes: towards rational design of therapeutics. *Antiviral Res*, 2012. **96**(2): p. 115-26.
90. Dong, H., B. Zhang, and P.Y. Shi, Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. *Antiviral Res*, 2008. **80**(1): p. 1-10.
91. Ray, D., et al., West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *J Virol*, 2006. **80**(17): p. 8362-70.
92. Zhou, Y., et al., Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J Virol*, 2007. **81**(8): p. 3891-903.
93. Rawlinson, S.M., et al., Dengue virus RNA polymerase NS5: a potential therapeutic target? *Curr Drug Targets*, 2006. **7**(12): p. 1623-38.
94. Chu, P.W. and E.G. Westaway, Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology*, 1985. **140**(1): p. 68-79.
95. Selisko, B., et al., Molecular basis for nucleotide conservation at the ends of the dengue virus genome. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(9): p. e1002912.

96. Potisoapon, S., et al., Substrate selectivity of Dengue and Zika virus NS5 polymerase towards 2'-modified nucleotide analogues. *Antiviral Res*, 2016. **140**: p. 25-36.
97. Yin, Z., et al., An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(48): p. 20435-9.
98. Zargar, N.D. and K.Z. Khan, Synthesis and Characterization of 2-Substituted Derivatives of 1, 3-Indandione. *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry*, 2012. **12**(5): p. 45-48.
99. Dubers, G., Organic and physical chemistry of 1,3-indanedione and related compounds, in *Progress in Medicinal Chemistry*. 1975, North Holland Publication: New York.
100. Durden, J.A., Biocidal activity of 1,3-indanedione and related compounds, in *Progress in Medicinal Chemistry*. 1975, North Holland Publication: New York.
101. Jeyachandran, M. and P. Ramesh, Synthesis, Antimicrobial, and Anticoagulant Activities of 2-(Arylsulfonyl)indane-1,3-diones. *Organic Chemistry International* 2011, 2011. **2011**(Article ID 360810): p. 5 pages.
102. Iradyan, M.A., et al., Imidazole derivatives—synthesis and radioprotective activity of substituted phenacylthioimidazoline and 3-phenyl-5,6-dihydroimidazo[2,1-B]thiazole hydrochlorides. *Pharm. Chem. J.* , 1994(28): p. 13-15.
103. Babu, A.R.S., et al., A highly regioselective synthesis of 1-N-methyl-spiro-[2,3''']-oxindole-spiro-[3,2''']indane-1'', 3''-dione-4-arylpyrrolidines through 1,3-dipolar cycloaddition protocol. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2006. **43**(6): p. 1467-1472.

104. Katarzyna, M. and B. Magdalena, Synthesis and pharmacological properties of 5- $[\alpha$ -(1,3-dioxo-2-indanyl)aryl]barbituric acids and 2-(arylmethylene)indan-1,3-diones. *Czasopismo Techniczne—Politechnika Krakowska*, 2007(104): p. 105-115.
105. Robert-Piessard, S., et al., Synthesis and pharmacological evaluation of 3-(2 and 4- pyridinyl)indane-1,3-diones and structurally related compounds exerting potential anti-inflammatory and antitumoral activities. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 1998. **56**(4): p. 160-168.
106. Fathy, A.L.F., M.M. Mohamaed, and E. Gawish, Synthesis of some new functionalized benzo[b]pyrans and indeno[1,2-b]pyrans of potential biological activity. *Journal of Chemical Research*, 1995(5): p. 178-179.
107. Mashaly, M., One-pot synthesis of new indeno[1,2-b]-4Hpyrans of potential biological activity. *Zhonghua Yaoxue Zazhi*, 1993(45): p. 175-177.
108. Liu, Y., et al., Investigating the origin of the slow-binding inhibition of HCV NS3 serine protease by a novel substrate based inhibitor. *Biochemistry*, 2003. **42**(29): p. 8862-9.
109. Goudreau, N., et al., Optimization and determination of the absolute configuration of a series of potent inhibitors of human papillomavirus type-11 E1-E2 protein-protein interaction: a combined medicinal chemistry, NMR and computational chemistry approach. *Bioorg Med Chem*, 2007. **15**(7): p. 2690-700.
110. Enchev, V., et al., Quantum chemical and spectroscopic study of the structure of 2-acetylindan-1,3-dione complexes with metal(II) ions. *J. Mol. Struct.*, 2003. **654**: p. 11-20.

111. Artico, M., et al., Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *J Med Chem*, 1998. **41**(21): p. 3948-60.
112. Davidson, W., et al., Characterization of the binding site for inhibitors of the HPV11 E1-E2 protein interaction on the E2 transactivation domain by photoaffinity labeling and mass spectrometry. *Anal Chem*, 2004. **76**(7): p. 2095-102.
113. Yoakim, C., et al., Discovery of the first series of inhibitors of human papillomavirus type 11: inhibition of the assembly of the E1-E2-Origin DNA complex. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. **13**(15): p. 2539-41.
114. Gubler, D.J., Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health*, 2011. **39**(4 Suppl): p. 3-11.
115. (WHO), W.H.O., Dengue, countries or areas at risk, 2011. 2012, WHO Press: Geneva.
116. Murray, N.E., M.B. Quam, and A. Wilder-Smith, Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*, 2013. **5**: p. 299-309.
117. Chancey, C., et al., The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 376230.
118. Vieira, M.A., et al., West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 2015. **93**(2): p. 377-9.
119. Pugachev, K.V., F. Guirakhoo, and T.P. Monath, New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever. *Curr Opin Infect Dis*, 2005. **18**(5): p. 387-94.

120. Clayden J, G.N., Warren S, Wothers P, Organic Chemistry. 2001, New York: Oxford University Press. Inc.
121. Mosaddegh E, I.M.R., Hassankhani A, ZrOCl₂.8H₂O as an recyclable catalyst for the clean synthesis of xanthenedione derivatives under solvent-free conditions. Arabian Journal of Chemistry, 2015. **5**: p. 77-80.
122. Chappell, K.J., et al., Mutagenesis of the West Nile virus NS2B cofactor domain reveals two regions essential for protease activity. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 4): p. 1010-4.
123. Johnston, P.A., et al., HTS identifies novel and specific uncompetitive inhibitors of the two-component NS2B-NS3 proteinase of West Nile virus. Assay Drug Dev Technol, 2007. **5**(6): p. 737-50.
124. Petrokova, H., et al., Role of hydroxyl group and R/S configuration of isostere in binding properties of HIV-1 protease inhibitors. Eur J Biochem, 2004. **271**(22): p. 4451-61.
125. Tomlinson, S.M. and S.J. Watowich, Anthracene-based inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease. Antiviral Res, 2011. **89**(2): p. 127-35.
126. Berg JM, T., JL, Stryer, L, Bioquímica, ed. 6. 2008, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
127. Wu, H., et al., Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(2): p. 1100-9.
128. de Sousa, L.R., et al., Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: inhibition kinetics and docking studies. Bioorg Med Chem, 2015. **23**(3): p. 466-70.

129. Heh, C.H., et al., Rational discovery of dengue type 2 non-competitive inhibitors. *Chem Biol Drug Des*, 2013. **82**(1): p. 1-11.
130. Othman, R., et al., Docking of noncompetitive inhibitors into dengue virus type 2 protease: understanding the interactions with allosteric binding sites. *J Chem Inf Model*, 2008. **48**(8): p. 1582-91.
131. Sidique, S., et al., Structure-activity relationship and improved hydrolytic stability of pyrazole derivatives that are allosteric inhibitors of West Nile Virus NS2B-NS3 proteinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009. **19**(19): p. 5773-7.