

NS2B-NS3pro as a Molecular Target Drugs Development against Dengue

NS2B-NS3pro como Alvo Molecular para o Desenvolvimento de Fármacos contra Dengue

Isabella Piassi Godói^{1*}; Martinelle Ferreira da Rocha Taranto²; William Gustavo de Lima¹; Ricardo José. Alves³; Moacyr Comar Júnior¹, Jaqueline Maria, Siqueira Ferreira²; Alex Gutteres Taranto¹

ABSTRACT

Dengue is an arboviral disease of great clinical relevance among neglected diseases. It is transmitted by Dengue virus (DENV), which infects about 25 million people worldwide each year. So far there is no available licensed vaccine or specific drug to be used against DENV, but only palliative treatments to overcome the symptoms of the disease, considered a serious public health problem. Among the molecular targets verified as strategies for developing antivirals against DENV, we highlight the serine protease complex NS2B-NS3pro, essential for the viral maturation and replication. This molecular target is found conserved in all four serotypes, acting in major viral processes. In this context, this study aimed to understand various aspects related to DENV and especially the protease complex NS2B-NS3pro as a catalytic mechanism and candidate inhibitors of this pharmacological target applied to dengue.

Palavras-chave: Dengue. NS2B-NS3pro. Inhibitors. Antiviral. Neglected disease

¹Laboratório de Modelagem Molecular, Campus Centro Oeste Dona Lindu/ Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis/MG, Brasil.

²Laboratório de Microbiologia, Campus Centro Oeste Dona Lindu/ Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis/MG, Brasil.

³Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

*Autor para correspondência: isabellapiassi@gmail.com

RESUMO

A dengue é uma arbovirose de grande relevância clínica dentre as doenças negligenciadas. Esta é transmitida pelo *Dengue vírus* (DENV), que infecta anualmente cerca de 25 milhões de pessoas no mundo. Até o momento, não se encontra disponibilizada nenhuma vacina licenciada ou fármaco específico a ser utilizado no combate ao DENV, mas sim tratamentos paliativos para contornar os sintomas da doença, considerada um grave problema de saúde pública. Dentre os alvos moleculares verificados como estratégias para o desenvolvimento de antivirais contra o DENV, destaca-se o complexo serino proteásico NS2B-NS3pro, essencial para a maturação e replicação viral. Esse alvo molecular encontra-se conservado em todos os quatro sorotipos, com atuação em importantes processos virais. Nesse contexto, o presente trabalho buscou compreender diversos aspectos referentes ao DENV e, principalmente, ao complexo proteásico NS2B-NS3pro como mecanismo catalítico e candidatos a inibidores deste alvo farmacológico aplicado ao dengue.

Keywords: Dengue. NS2B-NS3pro. Inibidores. Antiviral. Doença negligenciada

INTRODUÇÃO

A Dengue é considerada uma das mais importantes arboviroses que afetam o homem em termos de morbidade e mortalidade. Sua distribuição é global, mas concentra-se principalmente nas áreas tropicais e subtropicais (GUBLER *et al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência desta doença apresentou um aumento de 30 vezes nos últimos 50 anos. Além disso, estima-se que aproximadamente 390 milhões de casos de dengue ocorrem anualmente no mundo, com mais de 20.000 mortes por ano (WHO, 2012; BHATT *et al.*, 2013). Neste contexto, destaca-se o Brasil que ocupou o primeiro lugar no número total de casos de dengue (54,5%) e o sexto lugar em relação ao número de casos de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) (35,1%), em estudo envolvendo países das Américas no período entre 1980-2007 (LAUGHLIN *et al.*, 2012). Além disso, dados fornecidos pelo Ministério da Saúde (MS) registraram em 2013 cerca de 1 milhão e 470 mil casos da doença com 595 mortes (BRASIL, 2014).

O *Dengue vírus* (DENV) é o agente patológico causador desta importante arbovirose, apresentado-se em quatro sorotipos distintos antigenicamente (DENV 1-4), os quais podem apresentar variantes genéticas dentro de um mesmo sorotipo. Em 2013 foi divulgada a descoberta do quinto sorotipo, o DENV-5, que foi encontrado em amostras advindas de macacos da região da Malásia, mas que pode estar circulando entre seres humanos (NORMILE, 2013).

A transmissão do DENV entre humanos é feita através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes spp.* Diferente de outros arbovírus, o DENV possui um ciclo denominado urbano, sem a necessidade de reservatório selvagem intermediário e um ciclo silvestre, além de apresentar transmissão denominada vertical (DEROUICH *et al.*, 2003; CLETON *et al.*, 2012).

O espectro clínico da dengue é amplo, variando desde quadros assintomáticos e dengue clássica (DC) até formas hemorrágicas mais graves, por vezes fatais, como febre hemorrágica (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) (BRASIL, 2013). Na maioria das vezes, as pessoas infectadas pelos vírus não apresentam quaisquer manifestações clínicas. O percentual de infecções assintomáticas pode variar entre 26% a 56%, a depender de fatores tais com, fatores ambientais, características do hospedeiro, do vetor e do próprio vírus.

O DENV é um membro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* que engloba outros vírus de expressiva importância clínica como o oeste do Nilo (WNV), febre amarela (YFV), encefalite Japonesa (JEV) e Hepatite C (HCV) (RODPOTHONG; AUEWARAKUL, 2012). Os membros desta família se caracterizam por possuir uma fita simples de RNA, cujo material genético, dentro da célula do hospedeiro, é traduzido em uma poliproteína viral que será clivada por proteases celulares e virais gerando três proteínas estruturais: a do envelope (E), a proteína precursora de membrana (prM) e a do capsídeo (C), responsáveis pela formação de novas partículas virais, e sete não estruturais (*non structural* - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), aplicadas à virulência e a replicação (PERERA *et al.*, 2001; SHIRYAEV & STRONGIN, 2010).

Até o momento não se encontra disponível nenhuma terapia específica ou vacina contra o DENV, mas sim tratamentos paliativos para contornar os sintomas ocasionados pela doença (KALAYANAROOJ, 2011; WHO, 2012). Com isso, o controle da proliferação do vetor é uma das medidas mais importantes para reduzir o risco de transmissão da dengue, como campanhas educativas e busca de focos de larvas do mosquito *Aedes sp* (FIGUEIREDO, 2012).

Para o desenvolvimento de terapias específicas voltadas ao combate do DENV, torna-se de extrema importância avaliar e compreender os alvos moleculares essenciais dentro do ciclo biológico deste vírus (MITTL;

GRUTTER, 2006; NOBLE; SHI, 2012; SIMMONS *et al.*, 2012). Dentre os considerados estratégicos para o desenvolvimento de fármacos destacam-se proteína E (ZHANG, 2004; KAMPMANN *et al.*, 2009), proteína C (MA *et al.*, 2004) e, principalmente, NS2B-NS3pro, uma vez que estão associadas a processos essenciais ao DENV como o processo de infecção (entrada viral), maturação e replicação viral (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009; NOBLE *et al.*, 2010; BOLLATTI *et al.*, 2010). Adicionalmente, a estrutura de NS2B-NS3pro dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 encontra-se disponível no *Protein Data Bank* (PDB) sob os códigos 2FOM (ERBEL *et al.*, 2006) e 3U1I (NOBLE *et al.*, 2012), respectivamente. Estes dados permitem a construção dos alvos moleculares por modelagem comparativa por homologia (BORDOLI *et al.*, 2009).

Dentre as proteínas não estruturais destacam-se a NS5 (metiltransferase) e o complexo proteásico NS2B-NS3pro (serino protease). A NS5 possui na sua porção N-terminal atividade de metiltransferase (MTase) que é fundamental para a estabilização do genoma viral, convergindo desta forma em um potencial alvo terapêutico no desenvolvimento racional de drogas frente a esta doença (LIMA *et al.*, 2013). A NS3pro, dependente do cofator NS2-B, caracteriza-se por ser uma proteína conservada para os quatro sorotipos de dengue. As estruturas cristalográficas deste último alvo molecular aplicados aos sorotipos DENV-2 e DENV-3 encontram-se depositadas no PDB, o que permite o estudo deste alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos (LESCAR *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2005). Além disso, NS3 desempenha papel na clivagem da poliproteína viral, o que demonstra sua importância para o processo de maturação viral. Com isso, o complexo proteásico NS2B-NS3pro representa um importante alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos voltados ao combate ao DENV (TOMLINSON; MALMSTROM; WATOWICH, 2009a; WICHAPONG *et al.*, 2010; PHONG *et al.*, 2011; SCHÜLLER *et al.*, 2011).

Os diversos aspectos históricos, políticos, urbanos e ambientais vivenciados no Brasil nas últimas décadas corroboram para a caracterização da dengue como um dos grandes desafios da saúde pública no país. A este cenário relaciona-se as medidas de saúde implementadas no país, através dos modelos assistenciais, ao longo dos anos. Dentre estes se destaca o modelo Biomédico/Flexneriano de saúde implantado a partir da reforma sanitária, pelo governo Militar, com elementos e atividades antropocentrista, mecanicista, reducionista e tecnicista direcionada a saúde. Por sua vez, proporcionou debilidades em diversos serviços exemplificados pela ineficácia e desinteresse à promoção de ações preventivas para as doenças infecciosas como a dengue (MENDONÇA *et al.*, 2009; ALMEIDA, 2010).

A saúde é considerada um produto social diretamente relacionada a processos biológicos, ecológicos, culturais e econômicos (MENDES, 1996). Com isso, esforços devem ser realizados a fim de desenvolver políticas públicas de saúde direcionadas a atender as necessidades da população (MENDONÇA *et al.*, 2009). A partir das várias mudanças nas atividades em saúde concretizadas devem-se ainda considerar como desafios o fortalecimento nos serviços da atenção básica e incentivo a realização de pesquisas que atendam as necessidades clinico-sanitárias acometidas pela população, como o desenvolvimento de fármacos para o combate ao DENV, de modo a diminuir o sofrimento dos pacientes e gastos públicos advindos com a doença (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

ORGANIZAÇÃO E BIOSÍNTESE VIRAL

O genoma viral consiste de um RNA de sentido positivo (+ss RNA) de 11 kDa, que possui um grande quadro de leitura aberto (ORF) entre duas regiões não traduzidas (5'- UTR e 3'- UTR), sendo estas essenciais para processos como tradução e replicação do material genético viral (RODPOTHONG; AUEWARAKUL, 2012). Seu RNA codifica 10.173

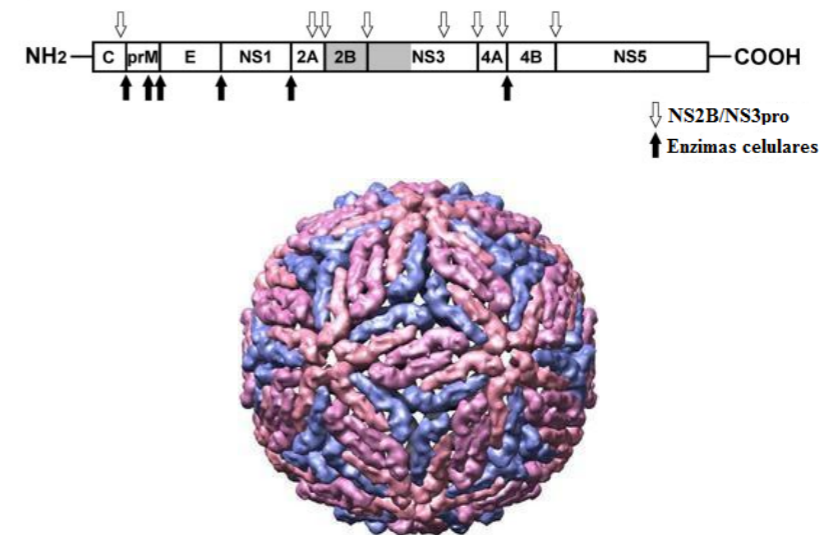
nucleotídeos que são traduzidos em uma poliproteína com 3.391 aminoácidos, que após ser processada por proteases virais e celulares, originam três proteínas estruturais sendo do envelope (E), proteína precursora de membrana (prM) e do capsídeo (C), que compõem as partículas virais, e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que estão relacionadas a processos como maturação (NS3pro), replicação (NS5) e virulência (NS1) (figura 1A). A NS1 destaca-se no contexto do diagnóstico da doença, uma vez que esta é detectada em amostras de sangue de pacientes infectados (WHITEHORN; FARRAR, 2010; HALSEY *et al.*, 2012).

O genoma viral é envolto pela proteína C formando o nucleocapsídeo, que fica envolvido por uma bicamada lipídica proveniente da célula hospedeira ancorando as proteínas E e M, formando espículas que são essenciais para a infectividade do dengue (MELINO; PACI, 2007; HALSEY *et al.*, 2012). O DENV encontra-se depositado no PDB sob o código (PDB: 1K4R) (figura 1B) (KUHN *et al.*, 2002).

A infecção pelo DENV se inicia com a adsorção da partícula viral à membrana da célula hospedeira, após a proteína E reconhecer receptores específicos na superfície celular (HALSEY *et al.*, 2012). Dentre alguns receptores associados ao processo de entrada deste vírus em células humanas destacam-se o *dendritic-cell-specific* (DC-SIGN) e *C-type lectin domain family 5* (CLEC5A) encontrados em células dendríticas e macrófagos, respectivamente (MORRISON *et al.*, 2012). Após se ligarem a espículas do envoltório viral, estes receptores modificam sua conformação e sinalizam ao citosol o recrutamento de clatrin que participam da endocitose do vírus (MELINO; PACI, 2007; MORRISON *et al.*, 2012). No citoplasma, a proteína E sofre modificações estruturais, mediadas pelo baixo pH dentro dos endossomos, o que permite a fusão com a membrana desta vesícula, liberando assim o nucleocapsídeo no interior da célula. Posteriormente, a partícula viral sofre desnudamento no citosol, liberando

o RNA, que a partir de então, está propício à tradução pelos ribossomos celulares (MELINO; PACI, 2007).

Figura 1 (A) Organização do genoma de DENV e locais de clivagem da poliproteína viral. (B) Estrutura do DENV depositada sob código PDB: 1K4R.



Fonte: KUHN *et al.*, 2002; LESCAR *et al.*, 2008, adaptado pela autora.

Em seguida, o RNA é traduzido gerando uma poliproteína viral que é conduzida ao retículo endoplasmático (RE), onde sofrerá clivagens a partir da peptidases endógenas e viral, destacando-se a NS2B-NS3pro. Por fim, as proteínas E, prM e NS1 são conduzidas ao lúmen do retículo, onde são processadas pela peptidase sinalase (LESCAR *et al.*, 2008) enquanto que as proteínas C, NS3 e NS5 voltam ao citosol e as proteínas não estruturais NS2A, NS2B, NS4A e NS4B permanecem retidas na membrana do retículo, comportando-se como proteínas transmembrânicas devido ao seu alto caráter hidrofóbico (MELINO; PACI, 2007).

Após a proteólise da poliproteína e a replicação do genoma viral, as partículas imaturas são formadas no lúmen do retículo pela complexação através das proteínas E e a prM em heterodímeros formando uma rede assimétrica de 60 trímeros. Estas partículas imaturas são levadas ao complexo de Golgi, no qual a protease furina, presente nestas organelas, clivam a região N-terminal da prM. Esta reação origina duas estruturas: a pr que é enviada ao citoplasma e a proteína M que complexa-se com a proteína E formando 90 homodímeros, de modo a contribuir para a formação da partícula madura viral (KAMPMANN *et al.*, 2009).

NS2B-NS3 COMO PROMISSOR ALVO FARMACOLÓGICO PARA O COMBATE AO DENV

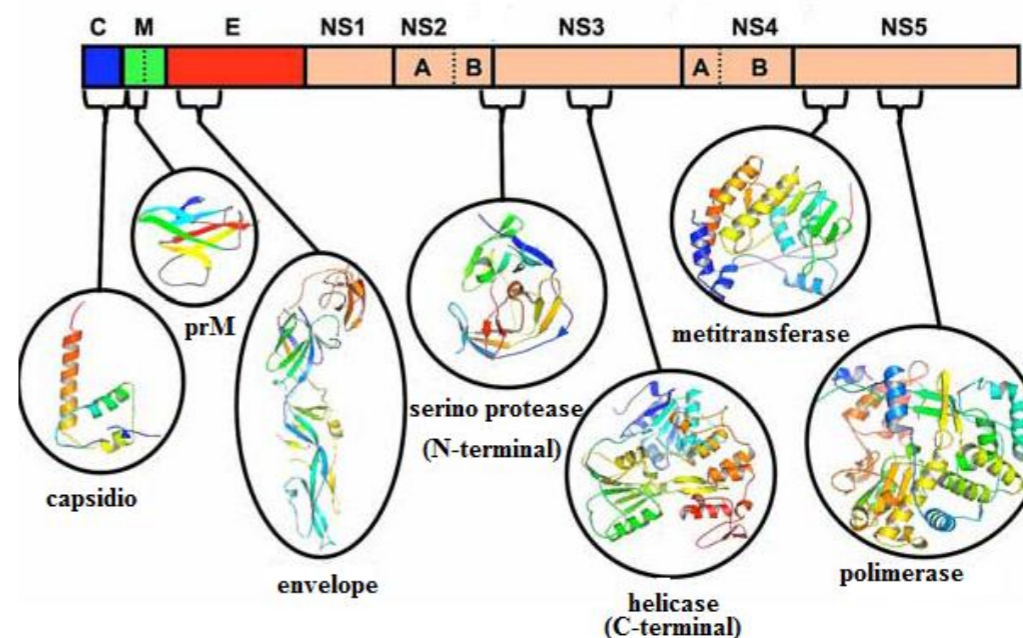
Várias estratégias podem ser aplicadas no processo de desenvolvimento de medicamentos antivirais, de modo a viabilizar o tratamento de milhares de pacientes. O reconhecimento e a compreensão dos possíveis alvos farmacológicos no contexto viral possibilitaram a descoberta de diversas terapias como, por exemplo, o tamiflu (oseltamivir) que através da inibição da enzima neuraminidase pode comprometer o sucesso da infecção pelo vírus influenza, de modo a contribuir para o tratamento da gripe (FATIMA *et al.*, 2005).

Diferentes processos virais podem estar diretamente associados com mecanismos de ação de compostos contra o DENV. Dentre eles, a inibição da entrada do vírus na célula hospedeira através da proteína E (KAMPMANN *et al.*, 2009) ou proteína C (MA *et al.*, 2004), inibição da clivagem da poliproteína viral pela NS2B-NS3pro e replicação viral através da NS5 (NOBLE *et al.*, 2010; BOLLATTI *et al.*, 2010). A figura 2 apresenta os principais alvos moleculares que podem ser utilizados no combate ao DENV.

Dentre os alvos farmacológicos, destaca-se a proteína multifuncional NS3pro, a qual apresenta papel essencial ao DENV pois auxilia no processo

de clivagem da poliproteína viral (TOMLINSON *et al.*, 2009b; WICHAPONG *et al.*, 2010; PHONG *et al.*, 2011; SCHÜLLER *et al.*, 2011). Para exercer todas as suas atividades faz-se necessário estar associada ao cofator NS2B, que contribui principalmente para sua estabilização estrutural (LESCAR *et al.*, 2008).

Figura 2 Alvos farmacológicos para o combate ao DENV.



Fonte: TOMLINSON; MALMSTROM; WATOWICH, 2009a, adaptado pela autora.

O complexo NS2B-NS3pro apresenta-se conservado nos quatro sorotipos de DENV, além de possuir o mesmo domínio catalítico (His51-Asp75-Ser135) encontrado na enzima tripsina, protótipo da classe das enzimas serinoproteases. Além disso, NS3pro é considerada um membro da família das enzimas flavivirina (EC 3.4.21.91) e das serino endopeptidases (S 07.001) (NATARAJAN, 2010). A NS3pro está associada não só a atividade proteásica, mas também a helicásica relacionadas com as porções N-

terminal e C-terminal, respectivamente (DONG *et al.*, 2008; BOLLATTI *et al.*, 2010).

A região N-terminal desta proteína possui aproximadamente 167 aminoácidos e apresenta um domínio serino protease, fundamentais para a clivagem da poliproteína viral (LESCAR *et al.*, 2008). A NS3pro apresenta-se em conformação β -barril com estruturas em alça. Em estudo realizado por Erbel e colaboradores (2006) foram destacados além dos resíduos da tríade catalítica, os aminoácidos Gly151, Gly153 e Tyr161 como importantes para o reconhecimento e formação da ligação dos candidatos a inibidores deste alvo molecular. Com isso, torna-se importante avaliar que a presença da interação entre um determinado ligante com os aminoácidos da tríade catalítica, de modo a contribuir para o desenvolvimento de potenciais inibidores desta serino protease (GODÓI *et al.*, 2013).

A estrutura cristalográfica do complexo NS2B-NS3pro do DENV-2 determinou a relevância de 47 resíduos (49-95) da região hidrofílica da porção N-terminal de NS2B como importantes para a ativação dessa serino protease (ERBEL *et al.*, 2006). O mecanismo molecular na estimulação da atividade proteásica de NS3pro promovida pelo seu cofator ainda não está totalmente esclarecido. Contudo, verifica-se que NS2B é fundamental para promover o enovelamento protéico deste alvo molecular em sua forma ativa. Através da estrutura cristalográfica do complexo NS2B-NS3pro de WNV constatou-se que porção N-terminal de NS2B (49-66) forma uma folha β inserida na região N-terminal (β -barril) de NS3pro (NATARAJAN, 2010).

Em estudo realizado por Erbel e colaboradores (2006) observaram-se diferenças conformacionais para a porção C-terminal de NS2B na presença e ausência de ligante. Neste contexto, destacaram-se a maior aproximação de resíduos como Arg78-Leu87 desta região, na presença do ligante, de modo a contribuírem para a formação do sítio ativo. Com isso, verifica-se a importância da utilização deste alvo molecular com a conformação na

presença do ligante. A NS3pro possui duas junções distintas, que contribuem na estabilização (N-terminal) e na formação do sítio ativo (C-terminal) desta serino protease do DENV (ERBEL *et al.*, 2006).

Adicionalmente, a região C-terminal deste alvo farmacológico está diretamente relacionado com a atividade RNA trifosfatase, que promove a desfosforilação da região 5' UTR para a adição de um domínio que possibilita sua ação helicásica. Estas enzimas estão envolvidas na região da abertura da dupla hélice de ácidos nucleicos durante a replicação, processo dependente de trifosfato de adenosina (ATP) (BOLLATTI *et al.*, 2010). Assim, a NS3 é formada por 3 subdomínios: o subdomínio I (resíduos 181-326) e II (resíduos 327-481) são constituídos cada um por 6 folhas β alternadas por 4 α -hélices, e o subdomínio III (resíduos 482-618) é formado por 4 α -hélices paralelas rodeadas por 3 α -hélices menores e 2 folhas β (ALEN; SCHOLS, 2012). Entre os aminoácidos Arg-460 e Gln-471 encontra-se o sítio de ligação de fosfato responsável pela atividade ATPase, conhecido como Walker A, que está envolvido na hidrólise do ATP, fornecendo a energia necessária para a atividade de helicase (MITTL; GRUTTER, 2006; ALEN; SCHOLS, 2012). Esta ligação de ATP é dependente de Mg^{2+} , no qual forma um complexo com as moléculas de ATP auxiliando em seu processo de hidrólise (SHIYAEV; STRONGIN, 2010).

MECANISMO DE AÇÃO SERINO PROTEASE

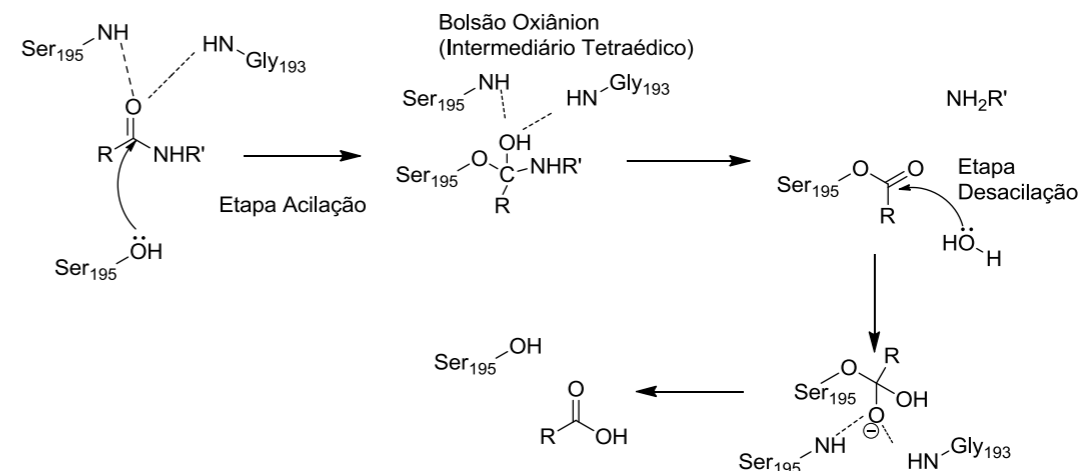
A classe das enzimas serino proteases são caracterizadas por catalisar hidrólises de ligações peptídicas ou de éster, sendo muito estudadas experimentalmente (NEMUKHIN *et al.*, 2004). O mecanismo catalítico envolvido nas enzimas da família das serinoendopeptidases (S 07.001) envolve a participação de uma tríade catalítica formada pelos resíduos histidina, aspartato e serina (NATARAJAN, 2010). Estes aminoácidos apresentam-se em posições estritamente conservadas e espacialmente correspondentes entre as diversas enzimas que compõem esta família,

como a quimiotripsina (His57-Asp102-Ser195), e a NS3-NS4A do vírus da hepatite C (HCV) (His57-Asp81-Ser139) (DENG *et al.*, 2012).

A reação catalisada pelas serino proteases envolvem as etapas de acilação e desacilação apresentadas na figura 3 (NEMUKHIN *et al.*, 2004). A etapa de acilação envolve uma série de reações químicas que têm com destaque o ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes do oxigênio, presente na hidroxila do resíduo Ser195, ao carbono centro eletrofílico do peptídeo. Com isso, verifica-se o rompimento da ligação peptídica e a formação de uma ligação éster entre o carbono carbonílico dos peptídeos e a enzima, contribuindo para a formação do intermediário tetraédrico. Esta é uma importante etapa dentro do processo catalítico das serinoproteases, sendo este estabilizado a partir de ligações de hidrogênio dos resíduos Ser195 e Gly193 com o oxigênio carbonílico, o que viabiliza o prosseguimento reacional de catálise, sendo o mecanismo proposto para a quimiotripsina (ALESHIN, 2007; SALAEMAE *et al.*, 2010).

No mecanismo de ação proposto para a quimiotripsina na fase de desacilação a ligação éster é hidrolisada e a enzima é regenerada (NEMUKHIN *et al.*, 2004). Além disso, as moléculas de água promovem a hidrólise da serina na etapa de desacilação, apresentado na figura 3 (NEMUKHIN *et al.*, 2004). Por fim, a Gly193 apresenta papel fundamental neste processo sendo um resíduo conservado nos *Flavivirus* e está relacionada com a estabilização do intermediário tetraédrico localizado no interior da enzima em região denominada orifício ou bolsão oxianion. A substituição desta por uma alanina resultou em uma eficiência catalítica dez vezes menor justificando sua relevância dentro do mecanismo das serino proteases (SALAEMAE *et al.*, 2010).

Figura 3 Mecanismo de ação das serino proteases.



Fonte: NEMUKHIN *et al.*, 2004, adaptado pela autora.

A análise dos aspectos do mecanismo de ação das serino proteases consiste em uma etapa essencial dentro do desenvolvimento de inibidores do alvo molecular NS2B-NS3pro, pertencente a esta classe enzimática.

INIBIDORES DO ALVO MOLECULAR NS2B-NS3PRO DENV

A elaboração de propostas de possíveis inibidores mais efetivos de NS2B-NS3pro somente é possível quando se conhece os constituintes presentes no sítio ativo do alvo molecular, uma vez que envolve informações como os aminoácidos e as interações intermoleculares envolvidas no processo de ligação inibidor-receptor (STEVENS *et al.*, 2009; PHONG *et al.*, 2011; SCHULLER *et al.*, 2011). Assim, estudos de modelagem molecular possibilitaram análises no intuito de caracterizar e avaliar esses aspectos, a fim de contribuir com a fundamentação teórica, essencial para viabilizar e aperfeiçoar etapas subsequentes como a síntese de inibidores mais promissores contra o dengue (TOMLINSON & WATOWICH, 2012). Com isso, duas abordagens bem distintas vêm sendo empregadas como estratégias na busca de novos compostos protótipos capazes de inibir o

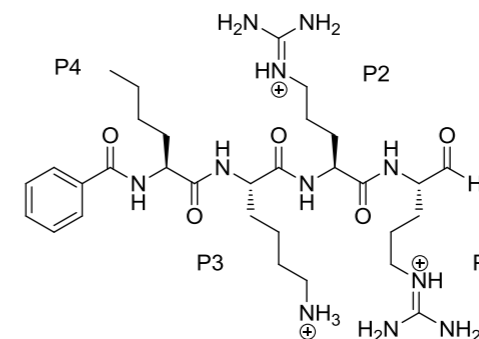
complexo NS2B-NS3, bioprospecção e triagem virtual (KIAT *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2009; FRECER; MIERTUS, 2010; TAMBUNAN; ALAMUDI, 2010; DENG *et al.*, 2012).

Inicialmente, testes *in vitro* mostraram que o inibidor de serino proteases aprotinina ($C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$), um polipeptídeo com 58 aminoácidos, apresentou ação inibitória do receptor CF40.glyNS3pro, com atividade proteolítica semelhante à protease NS3pro de HCV, com valor de concentração inibitória de 50% (IC_{50}) à 65 nM (LEUNG *et al.*, 2001).

A seguir, outros compostos de natureza peptídica foram testados como inibidores do complexo NS2B-NS3pro tais como [Bz-Nle-Lys-Thr-Arg] e [Bz-Nle-Lys-Arg-Arg] com constantes de inibição (K_{inib}) de 33,9 μ M e 12,42 μ M, respectivamente (LI *et al.*, 2005). A partir destes, houve o aperfeiçoamento da atividade biológica obtendo o tetrapeptídeo Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H com valor de K_{inib} de 5,8 μ M, onde a principal modificação molecular foi a inclusão de um grupo aldeído capaz de sofrer ataque nucleofílico do resíduo de serina da NS2B-NS3pro levando a sua inibição. Este é considerado um composto protótipo para esta classe de inibidores, a qual se encontra acoplado à NS2B-NS3pro do WNV disponível no PDB sob o código de 2FP7 (ERBEL *et al.*, 2006; FRECER; MIERTUS, 2010). Adicionalmente, estudos de relacionada estrutura e atividade (SAR) envolvendo Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H e demais derivados peptídeos mostraram que resíduos como arginina e lisina nas posições P1 e P2 dos candidatos a inibidores deste complexo proteásico são de natureza básica; enquanto que os peptídeos nas posições P3 e P4 são mais inespecíficos, destacando o caráter hidrofóbico para estes, sendo exemplificado pela norleucina (Nle). Com isso, puderam ser estabelecidas quatro posições para cada um dos quatro resíduos que compõem os tetrapeptídeos (P1-P4 – figura 4), estando correlacionadas diretamente com a possibilidade de interação com as porções S1, S2, S3 e S4, respectivamente, do sítio ativo. Estes dados possibilitaram a melhor compreensão do mecanismo de ação

farmacológico deste alvo molecular (ERBEL *et al.*, 2006; WICHAPONG *et al.*, 2010).

Figura 4 Porções dos resíduos dos tetrapeptídeos.



Fonte: FRECER; MIERTUS, 2010, adaptado pela autora.

De posse desta informação, uma série de derivados peptídicos foram sintetizados e submetidos à avaliação biológica como, por exemplo, Bz-Lys-Arg-Arg-H (K_{inib} 1,5 μ M – quadro 1). Os inibidores dessa natureza, em geral, possuem baixa biodisponibilidade e alta toxicidade, principalmente os derivados contendo átomos de boro e flúor em sua estrutura (YIN *et al.*, 2006a). Contudo, a partir desses derivados peptídicos, houve um crescimento nas pesquisas e estudos direcionados ao desenvolvimento de fármacos no contexto da dengue (YIN *et al.*, 2006b).

Como descrito anteriormente, na tentativa de desenvolver inibidores para este complexo proteásico, também surgiram trabalhos de bioprospecção a exemplo da obtenção de derivados do peptídeo cíclico denominado Kalata B1. Este possui dois isômeros (B e C), os quais apresentaram valores de K_{inib} de 1,39 e 3,03 μ M, respectivamente (quadro 1). Estes foram caracterizados como os primeiros compostos naturais

cíclicos promissores para a inibição de NS2B-NS3pro DENV-2 (GAO; CUI; LAM, 2010).

A seguir, os metabólitos hidroxipanturatina A e panturatina A, obtidos da espécie *Bolserbergia rotunda* (L), pertencentes à classe dos flavonóides e chalconas (KIAT *et. al.*, 2006) foram modificados levando a formação de três compostos semissintéticos denominados de 20H46DA, 2446DA e 246DA. Estes foram conduzidos para avaliação da atividade inibitória de NS2B-NS3pro, os quais apresentaram considerável atividade biológica, variando entre 19,84 à 39,68 μM (FRIMAYANTI *et al.*, 2011).

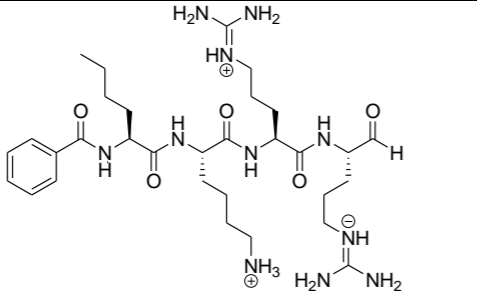
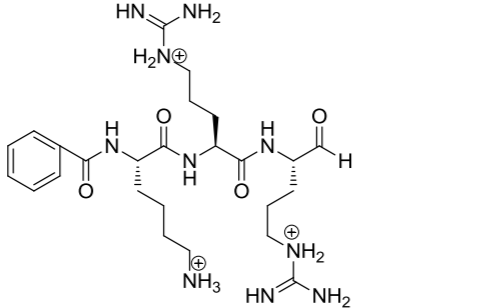
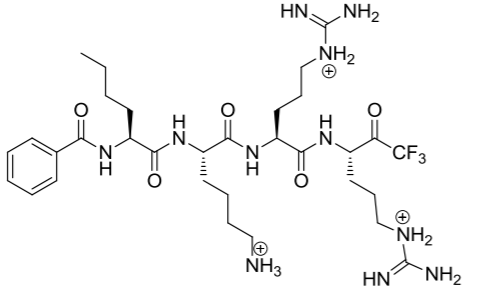
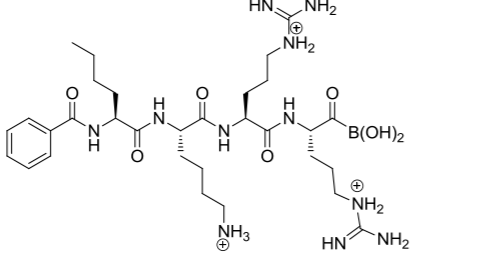
Neste contexto, destacam-se os estudos realizados a partir de derivados antracênicos, avaliados *in vitro* quanto ao potencial inibitório frente ao complexo NS2B-NS3pro DENV-2, dentre eles 6A60 ($7\pm 5 \mu\text{M}$) e 6A61 ($72\pm 15 \mu\text{M}$) (TOMLINSON & WATOWICH, 2011), conforme mostra o quadro 1.

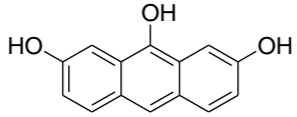
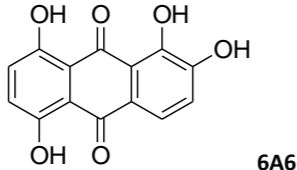
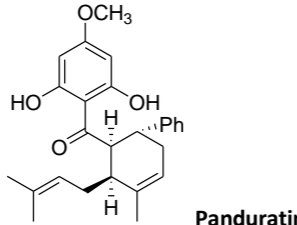
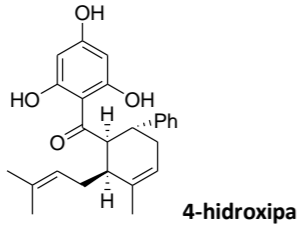
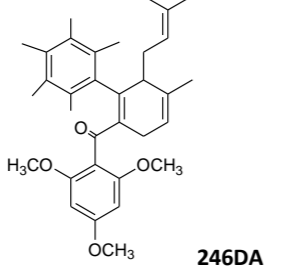
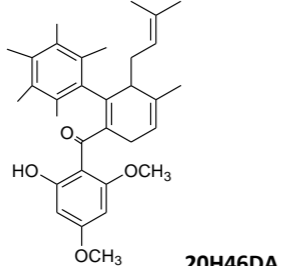
Finalmente, Pamdudi e colaboradores (2013), através da triagem virtual, destacaram o composto denominado SK-12, com estrutura química não disponibilizada, como um potencial inibidor deste alvo molecular. Os resultados apresentados no teste *in vitro* revelaram um maior potencial inibitório contra DENV-2 ($\text{IC}_{50} = 0,98\pm 0,39 \mu\text{M}$).

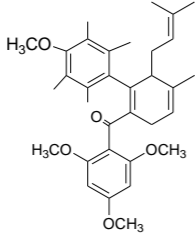
Atualmente, a tentativa de desenvolver inibidores do complexo NS2B-NS3pro DENV-2 perpassa por duas metodologias distintas, bioprospecção e

triagem virtual. A abordagem de buscar um inibidor através de fontes naturais possui a vantagem da diversidade estrutural; porém são limitadas quanto a questões metodológicas como tempo de extração, quantidades obtidas, dentre outras. Esta busca um determinado alvo molecular (não necessariamente a NS2B-NS3pro) por métodos de triagem experimental. Por outro lado, a triagem virtual aplica metodologias *in silico* bastante rápidas para encontrar novos compostos protótipos, porém esta também possui as limitações tais como falsos positivos e pouca diversidade estrutural (quando comparado aos produtos naturais) (CARREGAL *et al.*, 2012; CARREGAL; COMAR JUNIOR; TARANTO, 2013). Esta busca de ligantes em banco de dados possibilita o rastreamento de milhares de compostos para um alvo molecular específico. Independente da abordagem utilizada, pois ambos estão dentro do contexto de desenvolvimento racional de fármacos, fatores como baixa biodisponibilidade, elevada toxicidade e baixa atividade inibitória limitam o progresso de obtenção de uma terapia voltada para a inibição desse complexo proteásico. Sendo assim, novos estudos e estratégias devem ser realizados no intuito de viabilizar um tratamento efetivo e seguro aos pacientes infectados por DENV, que representa um grave problema de saúde mundial (DENG *et al.*, 2012).

Quadro 1: Compostos avaliados para o complexo NS2B-NS3pro.

| Composto | Constante Inibitória (K_{inib}) $\mu\text{M}/\text{nM}$ | Fonte |
|--|---|---------------------------|
|  <p>Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H</p> | 5,8 μM | YIN <i>et al.</i> , 2006b |
|  <p>Bz-Lys-Arg-Arg-H</p> | 1,5 μM | YIN <i>et al.</i> , 2006b |
|  <p>Bz-Lys-Arg-Arg-CF₃</p> | 0,85 μM | YIN <i>et al.</i> , 2006a |
|  <p>Bz-Lys-Arg-Arg-B(OH)₂</p> | 43 nM | YIN <i>et al.</i> , 2006a |

| | | |
|---|------------|---------------------------------|
|  <p>6A60</p> | 7 ± 5 μM | TOMLINSON; WATOWICH, 2011 |
|  <p>6A61</p> | 72 ± 15 μM | TOMLINSON; WATOWICH, 2011 |
|  <p>Panduratina A</p> | 25 ± 6 μM | KIAT <i>et al.</i> , 2006 |
|  <p>4-hidroxipanduratina A</p> | 21 ± 8 μM | KIAT <i>et al.</i> , 2006 |
|  <p>246DA</p> | 19,84 μM | FRIMAYANTI <i>et al.</i> , 2011 |
|  <p>20H46DA</p> | 24,36 μM | FRIMAYANTI <i>et al.</i> , 2011 |

| | | |
|--|--|---------------------------------|
|  <p>2446DA</p> | 39,68 μ M | FRIMAYANTI <i>et al.</i> , 2011 |
| <p>GLPCVGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN</p> <p>Kalata B</p> | <p>1,39 \pm 0,35 μM (Isômero B) 3,03 \pm 0,75 μM (Isômero C)</p> | GAO; CUI; LAM, 2010 |

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dengue é caracterizada como uma das mais importantes doenças negligenciadas uma vez que acomete milhões de pessoas em todo o mundo e, até o momento não encontra-se disponível nenhuma terapia ou vacina licenciada contra o DENV. Com isso, tratamentos paliativos na tentativa de contornar os sintomas da doença são as únicas medidas até então disponibilizadas no cenário clínico da mesma. Neste contexto, destacam-se estudos e iniciativas aplicadas ao desenvolvimento de fármaco contra o DENV. Para isso, têm-se a necessidade de compreender aspectos como a organização viral, bem como os possíveis alvos moleculares relacionados a processos essenciais ao mesmo. O complexo serino proteásico NS2B-NS3pro é reportado como um promissor alvo molecular para o planejamento racional de terapias contra a dengue. Uma série de compostos de natureza fitoquímica e, principalmente, peptídica foram avaliados frente ao potencial inibitório contra o DENV. Contudo, limitações como baixa biodisponibilidade, alta toxicidade e a não conclusão de testes pré-clínicos e clínicos daqueles que apresentaram resultados satisfatórios *in vitro*, culminam no não aprimoramento na busca de antivirais específicos contra este. Portanto, torna-se necessário a realização de novos estudos, investimentos e iniciativas públicas e privadas de modo a otimizar o avanço

das pesquisas direcionadas na busca efetiva de terapias aos milhares de pacientes acometidos por essa doença, considerada um grave problema da saúde pública.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMIG pelos recursos disponibilizados para a realização do projeto (CDS-APQ-02337-12, CBB-APQ-01301-11), bolsa de Isabella Piassi Godói e a CAPES pela bolsa de Martinelle Ferreira Taranto.

REFERÊNCIAS

- ALEN, M. M. F.; SCHOLS, D. Dengue Virus Entry as Target for Antiviral Therapy. **Journal of Tropical Medicine**, p. 1-13, 2012.
- ALESHIN, E. A. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the *Flaviviridae* fold. **Protein Science**, v. 16, p. 795-806, 2007.
- ALMEIDA, N.F. Reconhecer Flexner: inquérito sobre produção de mitos na educação médica no Brasil contemporâneo. **Cad. Saúde Pública**, v.26, n. 12, p. 2234-2249, 2010.
- BHATT, S. GETHING, P. W.; BRADY, O. J *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.
- BOLLATTI, M *et al.* Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. **Antiviral Research**, v. 87, p. 125-148, 2010.

BORDOLI, L *et al.* Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n.1, p. 1-14, 2009.

BRASIL, M. D. S. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 80p, 2013. Disponível em: < http://www.pro.fm.usp.br/arquivos/dengue_diagnostico_manejo_clinico_2013.pdf>. Acesso em: 15 de abril de 2014.

BRASIL, M. D. S. **Boletim Epidemiológico 2014**. Disponível em: < http://www.saude.mg.gov.br/publicacoes/estatistica-e-informacao-em-saude/boletim-semanal-dengue/folder_contents>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2014.

CARREGAL, A. P *et al.* Inverse virtual screening studies of selected natural compounds from cerrado. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 112, n. 20, p. 3333–3340, 2012.

CARREGAL, A.P.; COMAR JUNIOR, M.; TARANTO, A. G. Our Own Molecular Targets Data Bank (OOMT). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n.2, p.14-16, 2013.

CLETON, N *et al.* Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.

DENG, J *et al.* Discovery of Novel Small Molecule Inhibitors of Dengue Viral NS2B-NS3 Protease Using Virtual Screening and Scaffold Hopping. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.55, p. 6278-6293, 2012.

DEROUICH, M.; BOUTAYEB, A.; TWIZELL, E. H. A model of dengue fever. **Biomedical Engineering Online**, v. 2, p. 1-4, 2003.

DONG, H; ZHANG, B; SHI, P.Y. Flavivirus methyltransferase: A novel antiviral target. **Antiviral Research**, v. 80, p. 01-10, 2008.

ERBEL, P *et al.* Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 4, p. 372-373, 2006.

FATIMA *et al.* Ácidos siálicos: da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe. **Química Nova**, v. 28, n. 2, 306-316, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 285, 2012.

FRECER, V; MIERTUS, S. Design, structure-based focusing and in silico screening of combinatorial library of peptidomimetic inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease. **Journal Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, p.195-212, 2010.

FRIMAYANTI, N *et al.* Design of New Competitive Dengue Ns2b/Ns3 Protease Inhibitors—A Computational Approach. **International Journal Molecular Sciences**, v. 12, p. 1089-1100, 2011.

GAO, Y; CUI, T; LAM, Y. Synthesis and disulfide bond connectivity–activity studies of a kalata B1-inspired cyclopeptide against dengue NS2B–NS3 protease. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1331–1336, 2010.

GODÓI, I.P *et al.* Participação das moléculas de água nos Estudos de Anclagem Molecular de Inibidores de Protease do Vírus da Dengue. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n.2, p.48-50, 2013.

GUBLER, D.J; KUNO, G & MARKOFF, L. Flavivirus. IN: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.1155-1252, 2007.

HALSEY, E. S *et al.* Correlation of Serotype-Specific Dengue Virus Infection with Clinical Manifestations. **Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-10, 2012.

KALAYANAROOJ, S. Clinical Manifestations and Management of Dengue/DHF/DSS. **Tropical Medicine and International Health**, v. 39, p. 83-87, 2011.

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 Research**, v. 84, p. 234-241, 2009.

KIAT, T. S *et al.* Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 3337–3340, 2006.

KUHN, R.J *et al.* Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. **Cell**, v. 108, p. 717–725, 2002.

LAUGHLIN, C. A *et al.* Dengue Research Opportunities in the Americas. **Journal Infectious Diseases**, v.7, n.1, p. 1121-1127, 2012.

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 Research**, v. 80, p. 94-101, 2008.

LEUNG, D *et al.* Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, small Peptide Substrates, and Inhibitors. **Journal of Biology Chemistry**, v, 276, n. 49, p. 45762-45771, 2001.

LI, J *et al.* S. Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. **Journal of Biology Chemistry**, v. 280, p. 28766-28774, 2005.

LIMA, W.G *et al.* Triagem virtual e avaliação in silico de potenciais inibidores da NS5 metiltransferase do vírus do dengue. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n.2, p.38-41, 2013.

MA, L *et al.* Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **PNAS**, v. 101, n. 10, p. 3414-3419, 2004.

MELINO, S; PACI, M. Progress for dengue virus diseases: Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. **FEBS Journal**, v. 274, p. 2986-3002, 2007.

MENDES, E.V. Um novo paradigma sanitário: a produção social da saúde. 233-300. In MENDES, E.V. **Uma Agenda para a Saúde**. Ed. Hucitec, São Paulo. 1996.

MENDONÇA, F.A *et al.* Saúde Pública, Urbanização e Dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, v. 21, n. 3, p. 257-269, 2009.

MITTL, R. E. P; GRUTTER, G. M. Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, p. 769-775, 2006.

MORRISON *et al.* Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. **Viruses**, v. 4, p. 397-413, 2012.

NATARAJAN, S. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n. 2, p. 214-219, 2010.

NEMUKHIN, V. A *et al.* Modeling of serine protease prototype reactions with the flexible effective fragment potential quantum mechanical/molecular mechanical method. **Theoretical Chemistry Accounts**, Chem. Acc, v.111, p.36-48, 2004.

NOBLE, G. C *et al.* Strategies for development of dengue virus inhibitors. **Antiviral Research**, v. 85, p.450-462, 2010.

NOBLE, G, C; SHI, P.Y. Structural biology of dengue virus enzymes: Towards rational design of therapeutics. **Antiviral Research**, v. 96, p. 115-126, 2012.

NOBLE, G. C *et al.* Ligand-Bound Structures of the Dengue Virus Protease Reveal the Active Conformation. **Journal of Virology**, p. 438-446, 2012.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415, 2013.

PANDUDI, S *et al.* A small compound targeting the interaction between nonstructural proteins 2B and 3 inhibits dengue virus replication. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.440, p. 393-398, 2013.

PERERA, R *et al.* Structural Proteomics of Dengue Virus. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n.4, p. 369-377, 2001.

PHONG, W *et al.* Dengue protease activity: the structural integrity and interaction of NS2B with NS3 protease and its potential as a drug target. **Bioscience Reports**, v.31, p. 399-409, 2011.

RODPOTHONG, P; AUEWARAKUL, P. Positive selection sites in the surface genes of dengue virus: phylogenetic analysis of the interserotypic branches of the four serotypes. **Virus genes**, v. 44, 408-414, 2012.

SALAEMAE, W *et al.* Structure-guided mutagenesis of active site residues in the dengue virus two-component protease NS2B-NS3. **Journal of Biomedical Science**. v. 68, n. 17, p. 1-8, 2010.

SAMPATH, A; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**, v. 81, p. 6-15, 2009.

SCHÜLLER, A *et al.* Tripeptide inhibitors of dengue and West Nile virus NS2B-NS3 protease. **Antiviral Research**, v. 92, p. 96-101, 2011.

SHIRYAEV, S. A.; STRONGIN, Y.A. Structural and functional parameters of the flaviviral protease: a promising antiviral drug target. **Future Virology**, v.5, n.5, p.593-606, 2010.

SIMMONS, C. P *et al.* Dengue. **The New England Journal Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-32, 2012.

STEVENS, A. J *et al.* The medicinal Chemistry of Dengue Fever. **Journal of Medicinal Chemistry Perspective**, v.52, p.7911-7926, 2009.

TAMBUNAN, U. S. F; ALAMUDI, S. Designing cyclic peptide inhibitor of dengue virus NS3-NS2B protease by using molecular docking approach. **Bioinformation**, v. 5, p. 250-254, 2010.

TOMLINSON, M. S; MALMSTROM, D. R; WATOWICH, J. S. New Approaches to Structure-Based Discovery of Dengue Protease Inhibitors. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v.9, p. 1-17, 2009a.

TOMLINSON, M. S *et al.* Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. **Antiviral Research**, v. 82, p. 110–114, 2009b.

TOMLINSON, M. S; WATOWICH, J. S. J. Anthracene-based inhibitors of dengue virus NS2B–NS3 protease. **Antiviral Research**, v. 89, p. 127–135, 2011.

TOMLINSON, S. M.; WATOWICH, S. J. Use of parallel validation high-throughput screens to reduce false positives and identify novel dengue NS2B-NS3 protease inhibitors. **Antiviral Research**, v. 93, p. 245-252, 2012.

WHITEHORN, J.; FARRAR, J. Dengue. **Oxford Journal**, v. 95, 161-171, 2010.

WHO. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Disponível em Disponível em: <[http:// www.who.int/neglected_diseases](http://www.who.int/neglected_diseases)>. Acesso em 28 de julho de 2012.

WICHAPONG, K *et al.* Homology modeling and molecular dynamics simulations of Dengue virus NS2B/NS3 protease: insight into molecular interaction. **Journal Molecular Recognition**, v. 23, p.283–300, 2010.

YIN, Z *et al.* Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 36–39, 2006a.

YIN, Z *et al.* Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 40–43, 2006b.

ZHANG, Y. Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. **Structure**, v. 12, p.1607–1618, 2004.

RECEIVED 29 Sept 2014

ACCEPTED 22 Feb 2015