

# RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 28/02/2022.

Jacqueline Farinha Shimizu

**Avaliação de compostos naturais e sintéticos como antivirais contra o vírus do Chikungunya e Enterovírus 71.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Carolina Gomes Jardim

Co-orientador: Prof. Dr. Mark Harris

São José do Rio Preto

2020

S556a	<p>Shimizu, Jacqueline Farinha</p> <p>Avaliação de compostos naturais e sintéticos como antivirais contra o vírus do Chikungunya e Enterovírus A-71 / Jacqueline Farinha Shimizu. -- São José do Rio Preto, 2020</p> <p>87 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Ana Carolina Gomes Jardim</p> <p>Coorientador: Mark Harris</p> <p>1. antivirais. 2. vírus do Chikungunya. 3. Enterovirus A71. 4. peçonha de serpente. 5. docking molecular. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedico este trabalho aos meus pais, Fátima e Fernando, que  
sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Carolina Gomes Jardim pelos ensinamentos, conselhos, por toda atenção, paciência e por sempre ser um motivo de inspiração ao longo dessa jornada.

A todos os companheiros do Laboratório de virologia: Dani, Débora, Igor, Victória, Amanda, Sthéfanny, Suely, Ana Luíza e Thelma pela paciência, compreensão, pelas sugestões e amizade.

A UNESP pelos amigos que fiz durante o curso, por me mostrar que a universidade é muito mais do que aprendemos em sala de aula e pelos ensinamentos, os quais sempre levarei como exemplo ao longo da minha vida.

A UFU pelo espaço cedido.

A CAPES pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A toda a minha família pelo amor durante todas as etapas de minha vida.

A todos os amigos por estarem comigo ao longo de todo esse tempo.

A todas as pessoas que sempre me ajudaram, me apoiaram e acreditaram em mim, sem elas nada disso seria possível.

## RESUMO

Nas últimas décadas, diversos vírus que tinham sua ocorrência limitada a pequenas regiões se espalharam pelo globo, causando epidemias e preocupação entre as autoridades de saúde. Apesar dos inúmeros avanços no tratamento das infecções virais, vários destes vírus ainda não possuem tratamento específico e eficaz. Adicionalmente, a alta taxa de resistência e o surgimento de novas mutações, torna a busca por novos antivirais desafiadora e de extrema importância. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antiviral de compostos de origem natural ou sintética contra os vírus da Chikungunya (CHIKV) e Enterovirus A71 (EV-A71). Contra o CHIKV, 48.750 compostos sintéticos foram inicialmente avaliados *in silico* por *docking* molecular, dos quais 12 compostos demonstraram apresentar interação com a região de ligação a ADP-ribose do domínio macro da proteína viral não estrutural 3 (nsP3), e foram selecionados para ensaios *in vitro*. Ensaios de viabilidade celular foram realizados para determinar a máxima concentração não tóxica de cada composto, que foi utilizada nos ensaios anti-CHIKV em células de hepatocarcinoma humano Huh-7, transfectadas com os replicons subgenômicos do CHIKV. Os resultados demonstraram que os compostos C5 e C13 na concentração de 20  $\mu$ M inibiram 53 e 76% da replicação do CHIKV em células Huh-7, respectivamente. Contra o EV-A71, 6 proteínas isoladas da peçonha de serpentes foram testadas em concentrações não tóxicas em células Vero infectadas, sendo avaliadas a atividade virucida, protetiva e contra a replicação do EV-A71. Das toxinas testadas, a crotamina e MJTX-II apresentaram atividade para as três etapas avaliadas, inibindo até 100% da infectividade viral. A MJTX-I e a crotapotina apresentaram atividade virucida e protetiva, enquanto a crotoxina apresentou atividade virucida, e a PLA contra a replicação viral. Os resultados obtidos demonstraram que os compostos sintéticos testados contra o CHIKV apresentaram atividade moderada, porém significativa, contra a replicação do vírus. Adicionalmente, as proteínas isoladas da peçonha de serpentes demonstraram potente atividade antiviral contra o EV-A71. Mais estudos são necessários para avaliar o potencial dessas moléculas como modelos de antivirais, bem como para um melhor entendimento do mecanismo de ação antiviral.

**Palavras-chave:** antivirais; vírus do Chikungunya; Enterovirus A71; peçonha de serpente; *docking* molecular.

## ABSTRACT

In the last decades, several viruses that had their occurrence limited to small regions spread through the globe, causing epidemics and concern among health authorities. Despite the numerous advances in the treatment of viral infections, several of these viruses have no specific and effective treatment yet. In addition, the high rate of resistance and the emergence of new mutations, makes the search for new antivirals challenging and extremely important. The present work aimed to investigate the antiviral activity of compounds from natural or synthetic origin against Chikungunya virus (CHIKV) and Enterovirus A71 (EV-A71). Against CHIKV, 48,750 synthetic compounds were initially evaluated *in silico* by molecular docking, of which 12 compounds demonstrated to be interacting with the ADP-ribose binding region of viral non-structural protein 3 (nsP3) macro domain and were selected for *in vitro* assays. Cell viability assays were performed to determine the maximum non-toxic concentration of each compound and used in anti-CHIKV assays in human hepatocarcinoma cells (Huh-7) transiently transfected with the CHIKV subgenomics replicons. The results demonstrated that the C5 and C13 compounds at 20  $\mu$ M inhibited 53 and 76% of CHIKV replication in Huh-7 cells, respectively. Against EV-A71, 6 proteins isolated from snake venom were tested at non-toxic concentrations in infected Vero cells, and the virucidal, protective and anti-EV-A71 replication activity was evaluated. From the tested toxins, crostamine and MJTX-II presented activity for the three steps evaluated, inhibiting up to 100% of viral infectivity. MJTX-I and crostapotin showed virucidal and protective activity, while crostoxin showed virucidal activity, and PLA against viral replication. The results obtained demonstrated that the synthetic compounds tested against CHIKV showed moderate yet significant activity against virus replication. In addition, proteins isolated from snake venom demonstrated potent antiviral activity against EV-A71. Further studies are needed to assess the potential of these molecules as antiviral models, as well for a better understanding of the mechanism of antiviral action.

**Keywords:** antivirals; Chikungunya virus; Enterovirus A71; snake venoms; molecular docking.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACBD3</b>	<i>acyl- CoA</i> (acil-CoA)
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>C</b>	Proteína do Capsídeo
<b>CHIKV</b>	Vírus do Chikungunya
<b>DENV</b>	Vírus do Dengue
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio básico modificado por Dulbecco)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ECSA</b>	<i>East / Central / South Africa</i> (Leste/Centro/Sul da África)
<b>EV-A71</b>	Enterovirus A71
<b>HCV</b>	<i>Hepatitis C virus</i> (Vírus da hepatite C)
<b>HFMD</b>	<i>Hand-Foot-and-Mouth disease</i> (doença Mão-Pé-e-Boca)
<b>Huh-7</b>	<i>Hepatocyte derived cellular carcinoma cell line</i> (Linhagem de carcinoma celular derivado de hepatócito)
<b>hSCARB2</b>	Human scavenger receptor B2
<b>kB</b>	<i>Kilobase</i> (Quilobase)
<b>kDA</b>	<i>Kilodalton</i> (Quilodalton)
<b>MOI</b>	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplicidade de infecção)
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (Brometo de 3-(4',5'-dimetiltiazol-2'-ila)-2,5-difeniltetrazol)
<b>nsP</b>	<i>non-structural proteins</i> (Proteínas não estruturais)
<b>nsP3</b>	<i>non-structural protein 3</i> (Proteína não estrutural 3)
<b>OPAS</b>	Organização Pan Americana de Saúde
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ORFs</b>	<i>Open Reading Frame</i> (Regiões de leitura aberta)
<b>OSBP</b>	<i>Oxysterol- binding protein</i> (Proteína ligante de oxiesterol)
<b>PI4KB</b>	<i>Phosphatidylinositol4-kinase-β</i> (Fosfatidilinositol 4-quinase-β)
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RD</b>	<i>Rhabdomyosarcoma cells</i> (Células de rabdomiossarcoma)
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
<b>YFV</b>	<i>Yellow fever virus</i> (Vírus da febre amarela)
<b>WNV</b>	<i>West Nile virus</i> (Virus do Nilo Ocidental)
<b>WA</b>	<i>West African</i> (Oeste Africano)
<b>ZIKV</b>	<i>Virus do ZIKV</i>

**µg**

Micrograma

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Introdução</b>	<b>12</b>
1.1.2	Vírus do chikungunya	12
1.1.3	Enterovírus A-71	19
1.1.4	Compostos com potencial terapêutico	22
<b>1.2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
<b>1.3.</b>	<b>Referências</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO II: Is the ADP ribose site of the Chikungunya virus NSP3 Macro domain a target for antiviral approaches?</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO III: Proteins isolated from Brazilian snakes venom possess antiviral activity against Enterovirus 71</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO IV: Considerações finais</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE A: Artigos publicados</b>	<b>83</b>

## **CAPÍTULO I:**

### **Fundamentação Teórica**

## 1.1 INTRODUÇÃO

Há algumas décadas, várias epidemias vêm preocupando os órgãos de saúde pública mundial. O vírus do Chikungunya (CHIKV), anteriormente restrito a pequenas regiões da Ásia e África, hoje é responsável por diversos surtos em mais de 60 países, segundo a Organização mundial da Saúde (OMS - World Health Organization – WHO) (WHO, 2019).

O Enterovirus A71 (EV-A71) foi responsável na década de 1970 por pequenos surtos de meningite asséptica nos Estados Unidos, na Europa e na Austrália, e grandes surtos de doenças semelhantes à poliomielite na Bulgária e Hungria. No final da década de 90, o vírus se disseminou globalmente (PONS-SALORT; PARKER; GRASSLY, 2015).

Avanços tecnológicos como a descoberta de modelos biológicos *in vitro* e a engenharia molecular permitiram o isolamento e cultivo de vírus, assim como a possibilidade de avaliar o ciclo replicativo viral na busca por novos fármacos. Apesar do desenvolvimento de tais ferramentas, ainda existe uma escassez de tratamentos eficazes aprovados pelos órgãos de saúde contra infecções virais.

Diante deste contexto, o estudo de compostos que possam atuar como antivirais é de interesse econômico para melhorar o bem-estar de indivíduos acometidos por infecções virais, visando a melhoria dos tratamentos existentes e o desenvolvimento de novas terapias contra infecções que atualmente possuem apenas tratamentos paliativos.

### 1.1.2 Vírus do Chikungunya

#### **Histórico, transmissão e manifestações clínicas**

O CHIKV foi descrito pela primeira vez em 1950 na região da Tanzânia (LUMSDEN, 1955). Inicialmente, este vírus causava pequenos surtos em regiões da África e Ásia, e a partir de 2004 começaram a ocorrer surtos maiores da infecção (MCSWEEGAN et al., 2015). Desde então, a epidemia vem se espalhando e afetando milhares de pessoas em todo o mundo (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; WHO, 2019). O primeiro caso da infecção nas Américas foi registrado em dezembro de 2013 (WHO, 2017), e o primeiro caso autóctone da infecção no Brasil foi registrado em 13 de setembro de 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Segundo dados do Ministério da Saúde, em 18 de outubro do mesmo ano já haviam sido confirmados 682 casos autóctones de CHIKV no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Em 2016, a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) registrou 349.936 casos suspeitos de febre Chikungunya e 146.914 foram confirmados no Caribe e nas Américas (P.A.H.O,

# **Capítulo IV**

## **Considerações Finais**

### **Considerações Finais**

- Os resultados deste trabalho demonstram que os compostos testados, poderão servir de base para novos estudos em busca de terapias antivirais.
- O sistema virtual é um facilitador no processo de busca por novos antivirais, no entanto, não elimina outras variáveis em um sistema vivo e precisa ser combinada com ensaios biológicos.
- As proteínas isoladas da peçonha de serpentes apresentaram atividade inibitória significativa e que fornecerão informação para o potencial desenvolvimento de novas terapias antivirais.

### **Perspectivas para o futuro.**

Mais estudos são necessários para avaliar mecanismos de ação antiviral dessas moléculas, além da investigação de testes *in vivo* e vias de entrega para esses compostos.