



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Ygor Gabriel Pontieri Osti

**Avaliação do domínio ATPásico da proteína não estrutural 3 (NS3) do vírus da Zika e
investigação de derivados de hidantoínas e oxadiazol como agentes antivirais baseados
na estrutura da proteína**

São Carlos

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Ygor Gabriel Pontieri Osti

**Avaliação do domínio ATPásico da proteína não estrutural 3 (NS3) do vírus da Zika e
investigação de derivados de hidantoínas e oxadiazol como agentes antivirais baseados
na estrutura da proteína**

Trabalho de Conclusão de Curso

Orientação: Dra. Luana Galvão Morão

Co-Orientação: Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Resumo

Um dos grandes desafios no âmbito da saúde pública do Brasil tem sido relacionada à existência de flavivírus causadores de doenças com altos índices de contaminação, tais como a Dengue, Zika e Chikungunya. O desafio no combate a eles aumenta devido às condições climáticas propícias à disseminação de seus vetores comumente classificados dentro do gênero *Aedes*, cujo vetor comum entre os três é o *Aedes aegypti*. Foi reportada a presença de Zika vírus em território nacional no ano de 2015 e apesar de ter sido configurada como epidemia a Zika apresentava sintomas benignos e de baixa letalidade, no entanto, o fator preocupante vinculado ao Zika vírus (ZIKV) foi o surgimento repentino de complicações neurológicas graves: Síndrome de Guillain-Barre, em adultos, e Síndrome Congênita do ZIKV (microcefalia) em recém-nascidos, ocorridas na época da epidemia e que perduram nos dias atuais. Ainda não há cura ou vacina para prevenir a infecção pelo ZIKV, sendo a principal medida de prevenção, atualmente, o controle dos mosquitos transmissores. Dessa forma, a busca por moléculas com potencial capacidade de tornar-se fármacos se faz extremamente necessária e interessante. Sabe-se que dois processos são críticos para o ciclo de vida do vírus no hospedeiro humano: (1) infecção e (2) replicação viral. O processo de replicação depende essencialmente das proteínas não-estruturais codificadas pelo genoma viral. A NS3 tem dois domínios de proteínas: serina-protease (NS3^{Pro}) e RNA-helicase dependente de NTP (NS3^{Hel}), responsáveis respectivamente pela clivagem de poliproteínas após tradução e pelo desdobramento de uma fita dupla de RNA antes da polimerização e *capping* do RNA. Sendo assim, ao processar dados de “*fragment screening*” foram observados dois fragmentos promissores atuando como potenciais inibidores de NS3^{Hel}, sendo eles hidantoínas e oxadiazol. Contudo o presente trabalho deu continuidade ao que o grupo vem fazendo, no esforço de buscar moléculas candidatas a fármacos contra ZIKV e mostra a triagem de 28 moléculas derivadas de hidantoínas e oxadiazol testadas frente à atividade ATPásica de NS3^{Hel} a fim de explorar moléculas promissoras inibidoras dessa proteína. Também foi realizado o *Differential Scanning Fluorimetry (DSF)* para avaliar a estabilidade térmica, bem como a afinidade de ligação entre proteína-compostos promissores. Nestes ensaios, seis compostos mostraram perfil de inibição promissor acima de 70%, os quais continuarão a ser explorados em futuros ensaios do grupo.

Palavras-chave: ZIKV; NS3^{Hel}; atividade ATPásica; hidantoínas; oxadiazol.

Lista de figuras:

Figura 1 – Genoma do vírus Zika, Pág. 7.

Figura 2 – Estrutura do domínio helicase da NS3 de ZIKV mostrando os sítios de ligação do RNA e de ATP ou NTP, Pág. 10.

Figura 3 – Estrutura mostrando o sítio de ligação de RNA da helicase NS3 com os ligantes hidantoína e oxadiazol. Pág. 11.

Figura 4 – Docking de precisão extra (XP) de EGCG no sítio ATPase da helicase ZIKV NS3. Pág. 12.

Figura 5 – Exploração das interações que existem entre o resveratrol e os resíduos da helicase NS3 do vírus Zika. Pág. 12.

Figura 6 – Estrutura química da Manoalida. Pág. 13.

Figura 7 – Purificação de ZIKV NS3^{Hel} após expressão em Rosetta 2(DE3): M – marcador de peso molecular em kDa, Pág. 19.

Figura 8 – Curva padrão de fosfato livre para interpolação dos dados obtidos, Pág. 20.

Figura 9 – Placa transparente contendo os controles e a curva de diluição do padrão de fosfato. **CN:** controle negativo, sem a adição da NS3. **CP:** controle positivo, na presença da enzima ativa. **PF:** curva de diluição do padrão de fosfato, onde em maiores concentrações de fosfato, observa-se coloração esverdeada, e coloração amarela quando a concentração de fosfato é baixa. Pág.20.

Figura 10 – Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN550], Pág. 25.

Figura 11 – Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN552], Pág. 25.

Figura 12 – Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN551], Pág. 25.

Figura 13 – Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN853], Pág. 25.

Figura 14 – Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN573], Pág. 25.

Figura 15 – Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN839], Pág. 25.

Figura 16 – Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN961], Pág. 26.

Figura 17 – Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN960], Pág. 26.

Figura 18 – Gráfico do deslocamento na varredura (DSF) em comparação com o controle: **a.** Controle-ATP; **b.** NS3+LSPN550; **c.** NS3+LSPN551; **d.** NS3+LSPN573; **e.** NS3+LSPN852; **f.** NS3+LSPN853; **g.** NS3+LSPN839; **h.** NS3+LSPN961; **i.** NS3+LSPN960, Pág. 26-28.

Lista de tabelas:

Tabela 1. Triagem e seleção de compostos potenciais inibidores da ação ATPásica de NS3^{Hel}, Pág. 21.

Tabela 2. Temperaturas de melting (T_m) obtidas através de DSF, Pág. 23.

Sumário

1. Introdução

- 1.1. O vírus da Zika
- 1.2. Panorama do ZIKV
- 1.3. Proteínas não estruturais e NS3^{Hel}
- 1.4. Ensaio anteriores realizados pelo grupo e descoberta de derivados de Hidantoínas e Oxadiazol como moléculas promissoras
- 1.5. Prova de conceito, com base na literatura, e busca por moléculas inibidoras de NS3^{Hel}

2. Objetivos

3. Metodologia

- 3.1. Expressão e purificação das proteínas
 - 3.1.1. Expressão
 - 3.1.2. Purificação
- 3.2. Ensaio de atividade ATPásica para ZIKV NS3^{Hel}
- 3.3 Avaliação da estabilidade protéica e otimização das condições de estocagem e cristalização

4. Resultados e Discussão

- 4.1 Expressão e Purificação
- 4.2 Ensaio de atividade ATPásica e avaliação de estabilidade térmica por DSF (Differential Scanning Fluorimetry)

5. Conclusão

1. Introdução

1.1. O vírus da Zika

Os Flaviviridae são uma família de vírus de RNA envelopados positivos, de fita simples. Eles são encontrados em artrópodes e podem ocasionalmente infectar humanos. Dentre os flavivírus mais comuns, pode-se citar os vírus transmitidos por mosquitos que são responsáveis pela Febre Amarela, Dengue, Encefalite Japonesa, Vírus do Nilo Ocidental e Zika Vírus.

O vírus causador da Febre Zika, como os outros flavivírus, possui um genoma formado por uma única fita de RNA de sentido positivo com ~10,7 kb de comprimento, que é traduzida em uma única poliproteína através do complexo de transcrição da célula hospedeira. A poliproteína viral é entrelaçada na membrana do retículo endoplasmático (RE) e é subsequentemente clivada por proteases do hospedeiro no lado luminal do RE e por uma protease viral no lado citoplasmático do RE, resultando em dez proteínas distintas, que são divididas em dois grupos: proteínas estruturais (C, prM e E), as quais são as responsáveis pela formação do capsídeo viral maduro, e proteínas não estruturais (non structural proteins - ou NSP: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que incluem a protease viral e também as proteínas envolvidas na formação do complexo de replicação do vírus no interior da célula hospedeira ¹ (Figura 1).

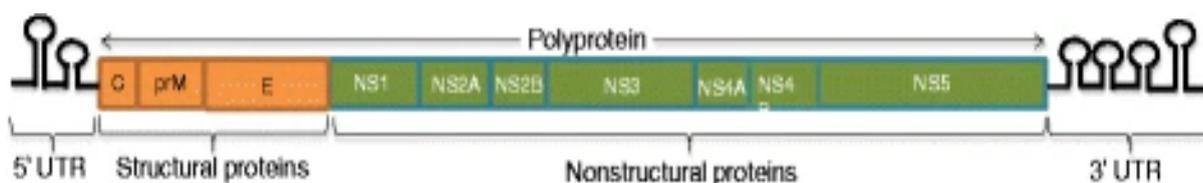


Figura 1. Genoma do vírus Zika ¹⁸

O genoma do vírus da Zika é codificado por proteínas homólogas às de todos os outros flavivirus, que estão presentes na mesma ordem e são flanqueadas por regiões 5' e 3'UTR (não-traduzidas). A região 5' UTR contém o promotor da transcrição e se inicia com um cap tipo I, seguido pelo dinucleotídeo conservado AG. A extremidade 3' não é poliadenilada e, em vez disso, é terminada com um CU_{OH} ao final de um *hairpin* conservado.

Dentre as proteínas estruturais, a proteína C compreende o capsídeo viral icosaédrico, enquanto as proteínas M e E são exibidas na superfície viral e possuem hélices

transmembranares que as ancoram na membrana. À medida que as partículas virais maduras eclodem, a proteína prM é clivada por uma protease do tipo furina localizada na rede trans-Golgi, originando o peptídeo pr e a proteína M. A proteína E é a principal proteína de superfície do vírion e está envolvida na ligação com a célula hospedeira e fusão da membrana.

As proteínas não estruturais (NS1-NS5) formam o complexo replicativo e também desempenham um papel no antagonismo da imunidade inata do hospedeiro: a proteína NS1 é altamente semelhante a outros flavivírus, com uma notável divergência no potencial eletrostático na superfície. Essa região divergente está envolvida na ligação de fatores do hospedeiro e anticorpos protetores, sendo um potencial alvo para antivirais. A proteína NS1 também está envolvida na evasão imune e parece desempenhar um papel na infecção viral. As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são proteínas hidrofóbicas que podem estar associadas à membrana, mas não têm funções, especificidades ou motivos enzimáticos conhecidos.

A proteína NS3 é uma das proteínas centrais para replicação viral e processamento de poliproteínas devido ao seu domínio de protease N-terminal e domínio RNA helicase C-terminal. Junto dela, a proteína NS5 tem duas atividades conhecidas: um domínio RNA-polimerase C terminal e um domínio metiltransferase N terminal responsável pelo capeamento ².

Dentre estas proteínas, existem diversos alvos para desenvolvimento de novos antivirais baseados na função que exercem no ciclo viral ³.

1.2. Panorama do ZIKV

O vírus Zika foi descoberto em Uganda, em 1947, porém a febre Zika foi tratada sem grande atenção, principalmente por se restringir inicialmente a um estreito cinturão equatorial, atravessando a África e Ásia, e sem sintomas graves conhecidos.

No entanto, entre 2015 e 2017, foi reportada uma pandemia nas zonas tropicais do globo terrestre, incluindo o Brasil, onde foi observado o grave sintoma de microcefalia em neonatos de gestantes infectadas. Além disso, foi reportado que o ZIKV é capaz de se adaptar à transmissão pelo *Aedes albopictus*, um mosquito de ampla distribuição, podendo levar ao aumento da área de dispersão do vírus e aumentando, também, a necessidade e interesse de estudar a doença bem como sua dispersão, uma vez que esse cenário pode vir a evoluir para uma nova pandemia ⁴.

Foi a partir da epidemia no Brasil que diversos grupos de pesquisa nacionais e internacionais têm realizado estudos acerca do vírus da febre Zika, seus mecanismos de infecção e efeito no ser humano. Um teste capaz de identificar anticorpos do tipo IgG presentes no sangue de organismos infectados foi desenvolvido por meio de uma parceria entre a empresa Inovatech, o Instituto de Ciências Biomédicas da USP e o Instituto Butantan⁶.

Além disso, diversos estudos têm sido realizados principalmente acerca de proteínas virais com funções enzimáticas essenciais para a replicação viral, tais como os descritos por Phoo e colaboradores (2016), Li e cols. (2017), assim como Fang e cols. (2016) e Mastrangelo e cols (2012)⁷⁻¹⁰. É importante citar também os trabalhos conduzidos pelo grupo como Lima e cols (2021), Fernandes e cols (2021) e Mottin e cols (2021)²²⁻²⁴. Além da busca por fármacos inibidores da replicação viral ou paliativos contra a infecção pelo ZIKV, existem estudos buscando o desenvolvimento de vacinas, como o realizado no Instituto Evandro Chagas¹¹. No entanto, apesar de todas essas buscas, ainda não existem tratamentos eficazes contra a febre Zika e a prevenção de ocorrência da mesma é basicamente associada ao controle da população dos mosquitos vetores (em cada território) do vírus causador. Assim, faz-se notória a necessidade da busca por possíveis candidatos a fármacos e vacinas eficazes contra o ZIKV.

1.3. Proteínas não estruturais e NS3 Helicase

A proteína não estrutural 3 (NS3) é um dos componentes cruciais para o processamento dos polipeptídeos virais e a replicação do vírus, e é constituída de dois domínios, um N-terminal com função de uma serino-protease e um C-terminal com função de helicase³.

O domínio helicase da NS3 (NS3^{Hel}) de ZIKV é composto por três subdomínios e possui dois sítios de ligação nas cavidades encontradas na junção desses subdomínios onde diferentes moléculas relevantes para a sua funcionalidade podem se ligar. A NS3^{Hel} é uma helicase dependente da ligação de NTPs e RNAs, ela utiliza a energia liberada após hidrolisar NTPs para realizar o desenovelamento do RNA viral durante o processo de replicação. A Figura 2 mostra a estrutura da NS3^{Hel} do ZIKV e a localização de seus sítios de ligação a NTPs e RNA.¹²⁻¹⁴

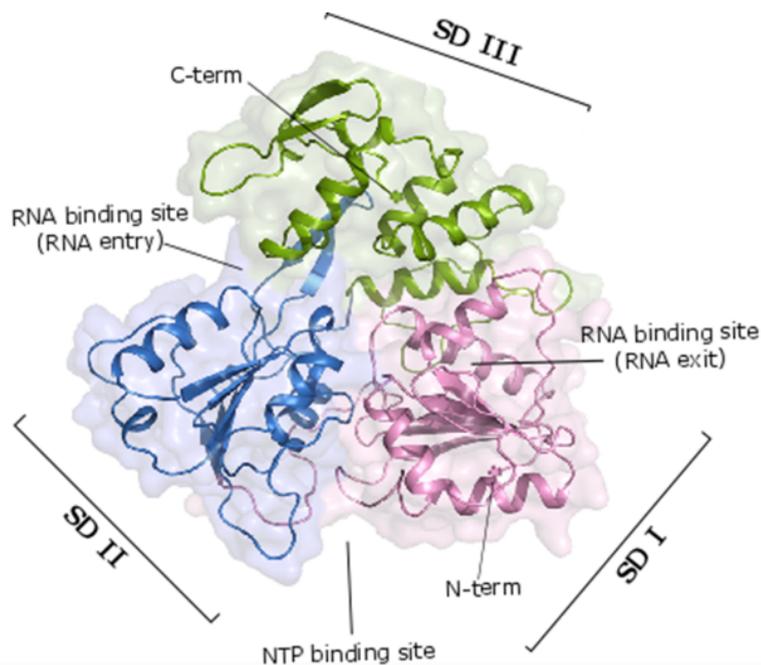


Figura 2. Estrutura do domínio helicase da NS3 de ZIKV mostrando os sítios de ligação do RNA e de ATP ou NTP

1.4. Ensaios anteriores realizados pelo grupo e descoberta de derivados de Hidantoínas e Oxadiazol como moléculas promissoras

Com o trabalho liderado pela pós-doutoranda Nathalya C.M.R. Mesquita realizado no nosso grupo de pesquisas CIBFar/CEPID, no período 2017-2020, foi possível realizar: (i) expressão e purificação da enzima NS3^{Hel}; (ii) cristalização, coleta de dados de difração (no LNLS) e elucidação da estrutura da enzima funcional à 1.9Å de resolução; (iii) ensaios bioquímicos e biofísicos *in vitro* para caracterização de proteína em solução (Dicroísmo Circular, Dynamic Scanning Fluorimetry e atividade ATPase). Com a implementação destes testes, foram estabelecidas parcerias do CIBFar com diversas instituições nacionais e internacionais, o que permitiu a triagem de 220 compostos e 373 fragmentos desde o início deste projeto. Inibidores promissores que possuem como alvo a atividade ATPase da NS3^{Hel} estão sendo agora caracterizados. Até o momento temos 15 compostos e 11 fragmentos promissores que estão sendo submetidos a ensaios de cristalização (*soaking* e co-cristalização), curvas de Dose–Resposta, que está sendo padronizada em nosso laboratório, e análise de afinidade por MicroScale Thermophoresis. Ao todo já são dois trabalhos publicados com abordagem do domínio de protease e um relacionado à NS3^{Hel} 22-24 .

Sendo assim a presente proposta está inserida no âmbito da testagem de compostos planejados com base na estrutura da NS3^{Hel}. Para tal finalidade contamos com a síntese de hidantoínas e seus derivados coordenados pela colaboração da Profa. Dra. Arlene

Gonçalves Correa do Departamento de Química da UFSCar. Em parceria, realizou-se uma busca de moléculas bioativas direcionada por fragmentos, na qual pequenos fragmentos foram testados individualmente na presença da proteína de interesse e a interação entre eles foi avaliada. Os fragmentos de hidantoína e oxadiazol foram aqueles que se demonstraram promissores em estudos de *high-throughput screening* (HTS) como possíveis ligantes inibidores da NS3^{Hel}. Dessa forma, baseado nos resultados de interação dos fragmentos com o alvo, buscou-se sintetizar estruturas contendo os fragmentos promissores, visando uma construção que atinja altos níveis de inibição. As metodologias de síntese dos compostos avaliados foram realizadas pelo grupo da Profa. Dra. Arlene em estudos ainda não publicados.

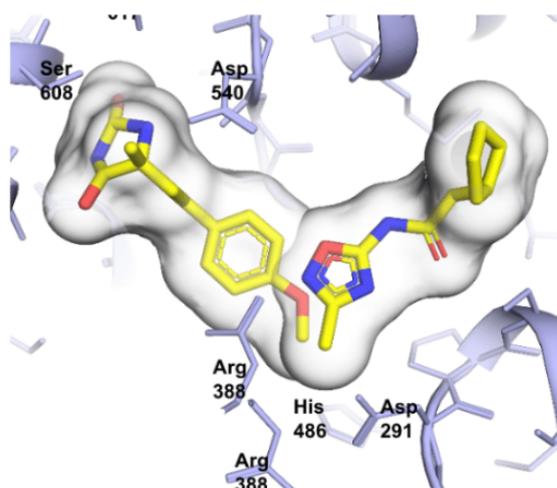


Figura 3. Estrutura mostrando o sítio de ligação de RNA da helicase NS3 com os ligantes hidantoína e oxadiazol.

1.5. Prova de conceito, com base na literatura, e busca por moléculas inibidoras de NS3^{Hel}

Um estudo acerca da (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), um polifenol encontrado no chá verde, que havia mostrado potencial virucida contra flavivírus, investigou a ação inibidora desse composto sobre a NS3^{Hel} do ZIKV. O estudo se utilizou de simulações e docking molecular e encontrou interações significativas no sítio ATPase e também no sítio de ligação do RNA. Os resultados mostraram inibição significativa da atividade da NTPase, sugerindo que o composto EGCG pode ser uma molécula promissora para o desenvolvimento de inibidores contra ZIKV e outros flavivírus. A Figura 4 mostra o ligante EGCG no sítio ATPase da NS3^{Hel}.

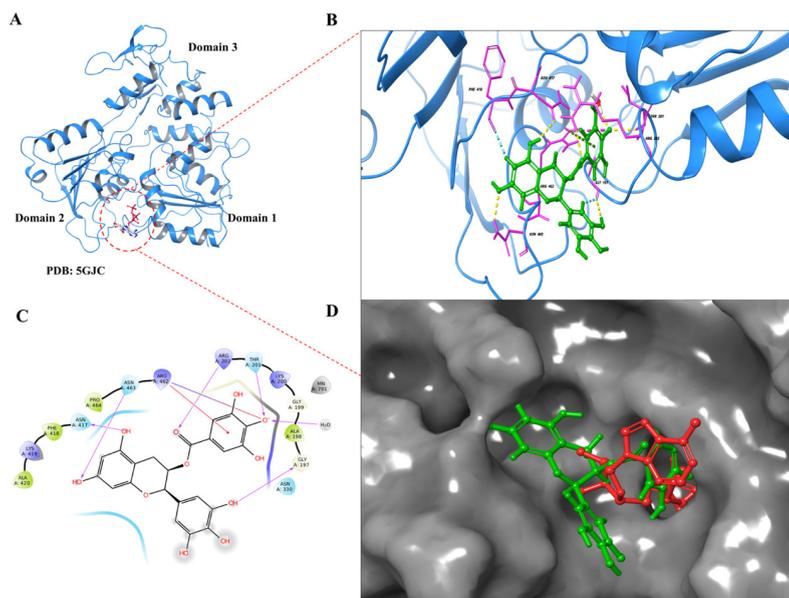


Figura 4. Docking de precisão extra (XP) de EGCG no sítio ATPase da helicase ZIKV NS3. (A) ZIKV NS3 helicase com PDB ID: 5GJC mostra a molécula de ATP ligada no sítio NTPase (círculo pontilhado vermelho) entre o domínio 1 e o domínio 2. (B) Após o encaixe molecular, EGCG exibe interações moleculares (vista 3D) por H- ligações (linhas pontilhadas amarelas), interações π -cátion (linhas pontilhadas verdes) e pontes salinas (linhas pontilhadas rosa). (C) Diagrama de interação 2D ilustrando interações de ligação de EGCG onde as interações são representadas como ligações H (seta rosa), interações π -cation (linha vermelha sólida) e pontes salinas (linha reta azul-vermelha). (D) NS3 helicase é representada como a superfície cinza sólida onde o EGCG encaixado (cor verde) se sobrepõe à molécula de ATP (cor vermelha) na bolsa de ATPase ¹⁵

Outro projeto de busca por antivirais contra ZIKV confirmou a ação inibidora do resveratrol sobre a NS3^{Hel}. Concluiu-se que o resveratrol causa um bloqueio no sítio de ligação ao RNA, reduzindo significativamente a atividade de hidrólise do ATP observada. A Figura 5 mostra as interações entre o resveratrol e o sítio helicase da NS3.

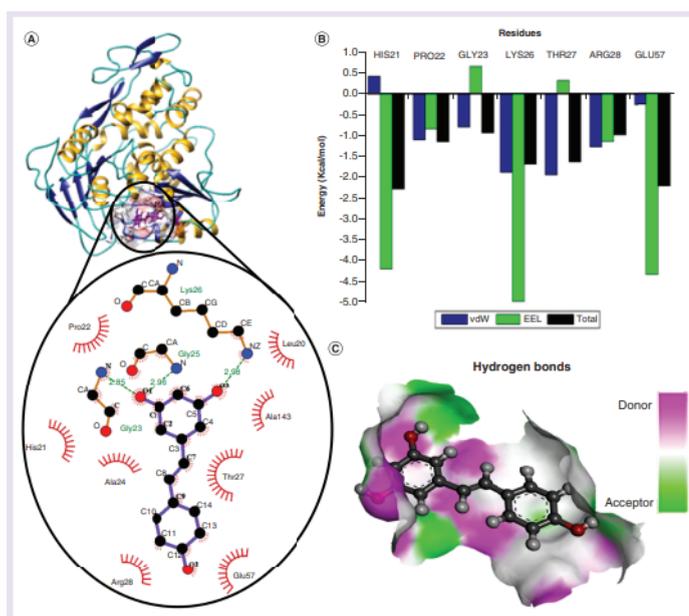


Figura 5. Exploração das interações que existem entre o resveratrol e os resíduos da helicase NS3 do vírus Zika. (A) Resveratrol dentro do bolso de ligação da helicase ampliando as interações hidrofóbicas e ligações de

hidrogênio entre os resíduos de ligação do ligante e Resveratrol. (B) Análise de decomposição por resíduo de resíduos de ligação ao ligante. (C) Ligação de hidrogênio na bolsa de ligação do ligante. EEL: Energia eletrostática; vdW: van der Waals ¹⁶.

Em outro estudo da NS3^{Hel} do vírus da Hepatite C utilizou-se a manoalida, um composto natural isolado da esponja marinha *Luffariella variabilis* como um potencial inibidor enzimático. Através de análises bioquímicas e cinéticas, foi identificado o efeito de inibição não competitiva e dose-dependente na presença de manoalida. Além disso, a manoalida também apresentou efeito inibitório sobre a atividade ATPase do DHX36/RHAU humano, levando à conclusão de que esse composto inibe as atividades ATPase e helicase de NS3 em HCV NS3 e DHX36/RHAU pois tem como alvo o domínio central da helicase, que é conservado. Faz-se então necessários novos estudos a fim de modificar o composto de forma que se obtenha atividade específica sobre a helicase de HCV, evitando o possível efeito citotóxico para os pacientes tratados com ele. Abaixo pode-se observar uma representação estrutura da manoalida.

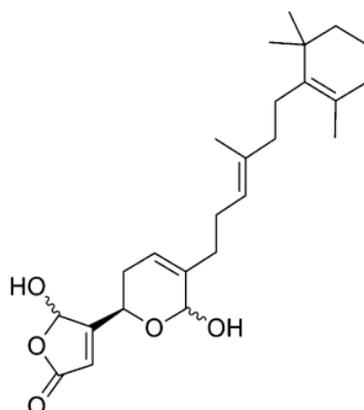


Figura 6. Estrutura química da Manoalida ¹⁷.

2. Objetivos

Dada a relevância da Febre Zika no contexto do país e a urgente necessidade da exploração de novas moléculas bioativas e passíveis de modulação farmacológica, o presente projeto tem como objetivo a investigação por inibidores ou ligantes derivados de hidantoínas e oxadiazol com potencial capacidade antiviral.

Objetivos específicos:

- i. expressão recombinante e purificação de NS3^{Hel} de ZIKV, utilizando sistema de expressão Rosetta 2 (DE3) *E. coli* já estabelecidas em nosso laboratório;
- ii. desenvolvimento de ensaio para a atividade ATPase da NS3^{Hel}, específica para a proteína estudada;
- iii. realização de triagem de novos compostos baseada na estrutura já conhecida, tais como derivados de hidantoínas e oxadiazol, segundo fragment screening realizado pelo grupo;

3. Metodologia

A fim de realizar a triagem de bibliotecas de moléculas possivelmente promissoras, será necessário, primeiramente, obter uma expressão de alto rendimento de NS3^{Hel}. É sabido que, em muitos casos, a otimização das condições de expressão representa um passo importante para a expressão de proteínas virais em bactérias. Além disso, o processo de cristalização é uma ferramenta importante no âmbito de planejamento de novos fármacos e/ou busca por moléculas bioativas inibidoras com potencial capacidade antiviral, uma vez que é possível utilizar das estratégias de screening de ligantes, fragment screening, dentre outras.

3.1. Expressão e purificação das proteínas

3.1.1. Expressão

As cepas hospedeiras Rosetta™ 2 são derivados de BL21 projetados para aumentar a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente usados em *E. coli*. Essas cepas fornecem tRNAs para 7 códons raros (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC e CGG) em um plasmídeo compatível resistente ao cloranfenicol. Os genes de tRNA são conduzidos por seus promotores nativos. DE3 indica que o hospedeiro é um lisogênio de λ DE3 e, portanto, carrega uma cópia cromossômica do gene T7 RNA polimerase sob o controle do promotor lacUV5. Tais cepas são adequadas para a produção de proteínas a partir de genes alvos clonados em vetores pET (pET M11- NS3^{Hel}) induzíveis com IPTG. Genótipo: F-ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR) ²⁵.

Para o plasmídeo com o gene codificante da NS3^{Hel} contido num estoque glicerinado de *E. coli* Rosetta 2 (DE3), foi elaborado um pré inóculo contendo 80 mL de meio LB, 50ug/mL de Canamicina e 50 ug/mL de Cloranfenicol. Visando o crescimento celular, foi incubado por 18 horas à 37°C e 210 rpm.

Seguido o tempo de incubação, foram adicionados 10 mL do pré-inóculo a cada litro de meio de cultura e feitos 8L de meio ZYM5052 ²⁷⁻²⁸ suplementado com Canamicina e Cloranfenicol nas mesmas concentrações citadas. Em seguida, incubou-se novamente à 37°C e 210 rpm até D.O = 0,6. Após esse período foi incubado à 18°C e 210 rpm por 17 h de indução. Os tampões A, B e C foram previamente preparados, (10 mM Imidazol, 500 mM NaCl 50 mM Tris base, 10% glicerol; pH 7), (500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 50

mM Tris base, 10% glicerol; pH 7) e (500 mM NaCl, 20 mM Bis-Tris, 10% glicerol; pH 7), respectivamente e serão utilizados nas próximas etapas do protocolo.

Após a expressão, o meio foi submetido à centrifugação a 5000 rpm à 4°C por 40 minutos para a coleta das células. O sobrenadante foi descartado e cada pellet ressuspendido e homogeneizado em 50 mL de tampão A.

3.1.2. Purificação

I. Lise

Os pellets foram descongelados em banho com água à temperatura ambiente e após descongelados, foram adicionados 0,2 mg/mL de Lisozima, 2 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), um inibidor de serino-proteases, 2 mM de Dithiothreitol (DTT) que atua como agente redutor, 500U Benzonase (endonuclease usada para degradar ácidos nucleicos presentes como contaminantes) e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Passado esse tempo, foi levado ao sonicador por 15 minutos (05 s ON, 10 s OFF).

Em seguida, adicionou-se mais 500U de Benzonase e incubou-se por 10 minutos em banho de gelo. Novamente foi submetido ao sonicador por 15 minutos (10 s ON, 05 s OFF). A etapa seguinte consistiu na separação dos debris celulares do extrato proteico por centrifugação durante 30 min à 12500 rpm à 4°C. O sobrenadante foi coletado para as etapas seguintes de purificação.

II. Cromatografia de Afinidade ao Níquel

O sobrenadante lisado foi submetido à cromatografia de afinidade ao níquel utilizando uma coluna Histrap HP de 5 mL através de AKTA HPLC. Os tampões utilizados nessa etapa foram A e B (composições já indicadas acima), nas respectivas bombas. A coluna foi lavada com 10 CV de Tampão A (W1). Em seguida, a coluna foi lavada com 10 CV de 10% de Tampão B (W10%) para remover as proteínas com interações inespecíficas. A eluição e coleta da NS3^{Hel} foi realizada a partir da passagem de 10 mL de Tampão B 100%, na qual a concentração de Imidazol foi de 500 mM.

3.2. Ensaio de atividade ATPásica para ZIKV NS3^{Hel}

O processo de desenovelamento de RNA duplex por NS3^{Hel} está acoplado à hidrólise de NTPs, necessária para a ligação inicial ao duplex, translocação e desenrolamento do substrato. É sabido que a NS3^{Hel} não apresenta especificidade em relação aos quatro tipos de NTPs como fonte de energia, todavia, os experimentos realizados foram padronizados com o uso de soluções de ATP¹².

Os ensaios para avaliação da atividade ATPásica de NS3^{Hel} foram realizados utilizando o kit comercial BIOMOL® Green (Enzo Life Sciences). Esse ensaio quantifica a atividade da quinase através da quantificação colorimétrica de fosfato (Abs. 600-680 nm) remanescente na solução após uma reação que é medida através da adição de um reagente o qual interrompe a reação e inicia o desenvolvimento da cor, que é lida 20-30 min depois. O valor da absorbância está correlacionado com a quantidade de PO₄ presente e é diretamente correlacionado com a quantidade de atividade da proteína. Para medir a inibição da atividade de NS3^{Hel} ATPase foram utilizadas placas de 96 poços, contendo tampão de reação (20 mM Bis-Tris, pH 7,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 0,005% Triton X-100 e 2% dimetilsulfóxido (DMSO) para os controles sem composto) NS3^{Hel} recombinante (500 nM) e ATP (50 μM), incubados à 37 °C, 100 rpm, por 10 min, para um volume de reação final de 50 μL. O controle negativo foi considerado apenas tampão de reação contendo 2% de DMSO com ATP (sem proteína), enquanto o controle positivo (CP) será tampão de reação contendo 2% de DMSO com ATP + proteína. Após a incubação, 100 μL de reagente foram adicionados a cada poço e incubados por 20 min a 37 °C e 100 rpm. A leitura da absorbância foi realizada à 620 nm. Para estudos de inibição, NS3^{Hel} foi incubada, inicialmente com 25 - 400 μM de compostos avaliados por 10 min antes da adição de ATP.

3.3 Avaliação da estabilidade protéica e otimização das condições de estocagem e cristalização

A técnica de fluorimetria de varredura diferencial (DSF – Differential Scanning Fluorimetry) foi utilizada para averiguar a temperatura de melting (T_m) da proteína NS3^{Hel} de ZIKV em solução, bem como sua estabilidade térmica em diferentes condições. Para isso, o equipamento qPCR System (Bio-Rad) foi utilizado para monitorar a interação da sonda SYPRO™ Orange Protein Gel Stain (ThermoFisher Scientific) com a proteína por excitação a 490 nm e emissão a 530 nm. Neste ensaio, aumenta-se a temperatura de 25 a 95 °C com

gradiente de 1 °C min⁻¹. A análise dos resultados e cálculo do T_m serão realizadas seguindo o protocolo descrito para a técnica ²¹. O método de DSF também foi utilizado após a obtenção da triagem de compostos que se mostraram promissores para inibição da atividade ATPase da NS3^{Hel} e, nesse contexto, foi elaborado utilizando condições ótimas tamponantes associadas à proteína e ligante promissor. Este ensaio permite avaliar se houve ou não deslocamento da varredura e conseqüentemente da T_m, apontando se o ligante apresenta características esperadas de inibidor promissor.

4. Resultados e Discussão

4.1 Expressão e Purificação

Após a execução do protocolo de expressão gênica da NS3^{Hel}, seguiu-se para o protocolo de purificação da proteína objetivando a obtenção da enzima ativa para fins de execução de estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais. A análise em SDS-PAGE 12,5% dos passos cromatográficos está representada na Figura 7. A proteína pura foi quantificada através de Nanodrop, e seguiu-se para a etapa ensaios de atividade ATPase. Obteve-se rendimento de 6,45 mg de proteína por litro de expressão. A NS3^{Hel} apresenta 49,19 kDa de massa, coeficiente de extinção molar (ϵ) = 64,77 (ProtParam).

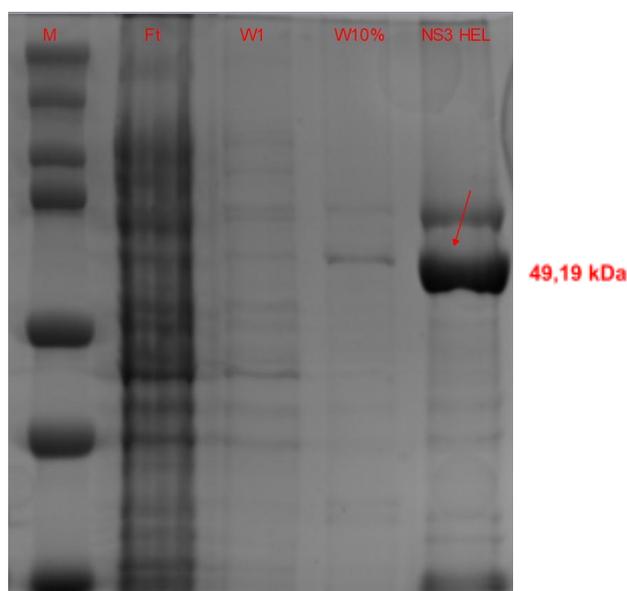


Figura 7. Purificação de ZIKV NS3^{Hel} após expressão em Rosetta 2(DE3): **M** – marcador de peso molecular em kDa. **Ft** – Flow Trough. **W1** – Lavagem com Tampão A. **W10%** – Lavagem com 10% de Tampão B. **NS3 HEL** – Fração referente à eluição da NS3^{Hel} (banda indicada pela seta) pela passagem de 10 mL de Tampão B 100%, na qual a concentração de Imidazol foi de 500 mM.

4.2 Ensaios de atividade ATPásica e avaliação de estabilidade térmica por DSF (Differential Scanning Fluorimetry)

O ensaio de atividade ATPásica foi padronizado utilizando-se o kit BIOMOL Green (Enzo Life Sciences) cuja concentração ideal de substrato (ATP), obtida em testes preliminares, foi de 50 μ M. A padronização da quantificação de PO₄ liberado remanescente da

hidrólise de ATP pela NS3^{Hel} foi iniciada com a elaboração de uma curva de linearidade padrão, que mostrou uma correlação dose-dependente do tempo de reação em função da quantidade de fosfato remanescente quando utilizou-se 50 μM de ATP como substrato (expresso pela leitura da absorbância em 620 nm). Com a curva de linearidade estabelecida, partiu-se para a elaboração de uma curva padrão de fosfato, cujo reagente é fornecido pelo kit utilizado. A curva foi feita através de diluições seriadas do padrão de fosfato no tampão de reação. Sendo assim a curva padrão obtida foi utilizada para gerar uma curva sigmoidal não linear cuja equação é utilizada para interpolação dos valores obtidos para os ensaios de atividade ATPásica, considerando também a subtração do controle branco (amostra contendo apenas tampão) bem como a normalização dos dados com esse valor. Sendo assim, as Figuras 8 e 9 mostram o gráfico obtido neste teste e o teste de coloração dos controles e da curva padrão.

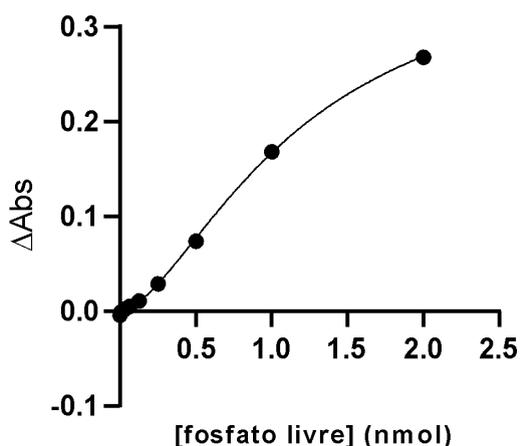


Figura 8. Curva padrão de fosfato livre para interpolação dos dados obtidos. Δabs representa os valores de absorbância já subtraídos do branco. A curva apresentou $R^2=0,9996$

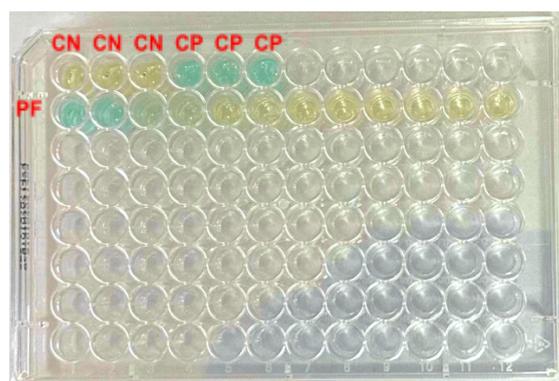


Figura 9. Placa transparente contendo os controles e a curva de diluição do padrão de fosfato. **CN:** controle negativo, sem a adição da NS3. **CP:** controle positivo, na presença da enzima ativa. **PF:** curva de diluição do padrão de fosfato, onde em maiores concentrações de fosfato, observa-se coloração esverdeada, e coloração amarela quando a concentração de fosfato é baixa.

Foi possível avaliar pelo teste de linearidade dose-resposta da proteína que a concentração mínima possível detectada para avaliação de atividade poderia ser entre 200 nM a 1 μM . Optamos pela utilização de 1 μM de NS3^{Hel}. Finalmente iniciamos a triagem de compostos com potencial inibitório para a atividade ATPásica de NS3^{Hel}. Ao todo foram avaliados vinte e oito compostos de hidantoínas, oxadiazol e seus derivados, sintetizados e fornecidos pela Profa. Dra. Arlene Gonçalves Corrêa do Departamento de Química da

UFSCAR. A concentração testada inicialmente para o screening de compostos foi de 200 μM . Em seguida os valores foram avaliados para a seleção dos mais promissores.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1 e correspondem à triagem inicial dos 28 compostos, comparados aos controles positivo e negativo. Considerando que quanto maior a atividade exercida por NS3^{Hel} , maior será a concentração de fosfato liberado na reação final, enquanto que quando um composto age inibindo o sítio de ligação entre NS3^{Hel} -ATP há um decaimento da atividade enzimática e, conseqüentemente, na quantidade de fosfato liberado, selecionou-se aqueles compostos que inibiram pelo menos 70% da atividade da NS3^{Hel} .

Tabela 1. *Triagem e seleção de compostos potenciais inibidores da ação ATPásica de NS3^{Hel}*

Compostos (Hidantoínas e Oxadiazol)	[Fosfato livre] (nmol) x [Composto testado] (μM)				
	200	100	50	25	12,5
LSPN461*	0,98 \pm 0,22	1,20 \pm 0,09	1,38 \pm 0,01	1,41 \pm 0,06	1,48 \pm 0,03
LSPN469*	0,98 \pm 0,09	1,30 \pm 0,14	1,37 \pm 0,07	1,39 \pm 0,03	1,65 \pm 0,02
LSPN550*	1,13 \pm 0,15	1,15 \pm 0,07	1,36 \pm 0,06	1,48 \pm 0,01	1,65 \pm 0,11
LSPN551*	0,62 \pm 0,10	1,21 \pm 0,44	1,31 \pm 0,09	1,32 \pm 0,03	1,42 \pm 0,09
LSPN552*	1,11 \pm 0,16	1,21 \pm 0,09	1,33 \pm 0,04	1,44 \pm 0,06	1,73 \pm 0,10
LSPN553	1,28 \pm 0,07	1,50 \pm 0,11	1,53 \pm 0,09	1,72 \pm 0,2	2,36 \pm 0,24
LSPN564*	0,99 \pm 0,22	1,32 \pm 0,01	1,45 \pm 0,02	1,52 \pm 0,08	1,54 \pm 0,09
LSPN565*	1,16 \pm 0,04	1,36 \pm 0,06	1,45 \pm 0,07	1,53 \pm 0,11	1,65 \pm 0,07
LSPN566	1,34 \pm 0,03	1,45 \pm 0,04	1,46 \pm 0,08	1,51 \pm 0,07	1,79 \pm 0,18
LSPN578	1,34 \pm 0,09	1,48 \pm 0,02	1,59 \pm 0,09	1,66 \pm 0,14	1,97 \pm 0,3

LSPN579	1,31 ± 0,06	1,46 ± 0,09	1,53 ± 0,12	1,64 ± 0,16	1,51 ± 0,05
LSPN580*	1,21 ± 0,01	1,26 ± 0,02	1,31 ± 0,04	1,37 ± 0,07	1,55 ± 0,09
LSPN585*	1,00 ± 0,16	1,21 ± 0,04	1,34 ± 0,01	1,40 ± 0,19	1,65 ± 0,33
LSPN572*	1,22 ± 0,02	1,31 ± 0,06	1,42 ± 0,02	1,46 ± 0,01	1,60 ± 0,15
LSPN573*	1,06 ± 0,04	1,16 ± 0,02	1,37 ± 0,21	1,51 ± 0,32	2,22 ± 0,01
LSPN852*	0,99 ± 0,05	1,19 ± 0,11	1,31 ± 0,10	1,49 ± 0,02	1,55 ± 0,04
LSPN853*	1,09 ± 0,07	1,20 ± 0,09	1,33 ± 0,05	1,41 ± 0,64	1,65 ± 0,10
LSPN855*	1,21 ± 0,04	1,28 ± 0,04	1,40 ± 0,21	1,58 ± 0,31	1,89 ± 0,01
LSPN856	1,32 ± 0,03	1,35 ± 0,03	1,40 ± 0,14	1,57 ± 0,49	2,12 ± 0,01
LSPN857	1,36 ± 0,06	1,39 ± 0,03	1,43 ± 0,09	1,47 ± 0,06	1,53 ± 0,02
LSPN858	1,38 ± 0,06	1,44 ± 0,02	1,45 ± 0,02	1,46 ± 0,19	1,66 ± 0,06
LSPN838	1,42 ± 0,02	1,44 ± 0,01	1,49 ± 0,01	1,58 ± 0,22	1,83 ± 0,06
LSPN839*	1,21 ± 0,15	1,34 ± 0,42	1,35 ± 0,02	1,39 ± 0,03	1,87 ± 0,02
LSPN547	1,28 ± 0,03	1,30 ± 0,04	1,39 ± 0,15	1,52 ± 0,14	1,56 ± 0,05
LSPN548*	1,14 ± 0,07	1,32 ± 0,01	1,40 ± 0,05	1,72 ± 0,45	2,17 ± 0,09
LSPN961	1,26 ± 0,02	1,30 ± 0,03	1,52 ± 0,09	1,57 ± 0,15	1,78 ± 0,14
LSPN960	1,27 ± 0,01	1,45 ± 0,07	1,54 ± 0,02	1,61 ± 0,11	1,91 ± 0,16
LSPN859	1,22 ± 0,08	1,24 ± 0,07	1,28 ± 0,06	1,48 ± 0,08	1,61 ± 0,04

*Compostos que inibiram acima de 70% da atividade ATPásica da NS3^{Hel}

CN (controle negativo) valor de fosfato livre sem a presença de NS3^{Hel}: $0,15 \pm 0,08$

CP (controle positivo) valor de fosfato livre com a presença de NS3^{Hel}: $4,01 \pm 0,05$

Ao todo foram dezessete compostos que apresentaram percentual inibição de atividade ATPásica acima de 70%. Foi então realizado um ensaio de DSF a fim de uma avaliação detalhada, visando estabelecer uma análise comparativa entre percentual de inibição de atividade e aumento da temperatura de melting. O esperado era que, na presença de inibidores, houvesse um aumento da Temperatura de melting (T_m), indicando que a presença dos ligantes confere maior estabilidade térmica ao complexo de ligação proteína-composto. Contudo, o DSF apontou que oito deles apresentaram pequena alteração na T_m , consequentemente deslocamento na curva sigmoidal, e estão destacados na Tabela 2.

Tabela 2. Temperaturas de melting (T_m) obtidas através de DSF

Código do composto avaliado	Temperatura de melting (T_m) °C
Controle (NS3 + tampão)	$32,00 \pm 0,21$
NS3 + ATP	$32,86 \pm 0,56$
LSPN461	$32,25 \pm 0,35$
LSPN469	$31,64 \pm 0,42$
LSPN550	$32,67 \pm 0,25$
LSPN551	$32,68 \pm 0,02$
LSPN552	$30,895 \pm 0,32$
LSPN553	$31,9 \pm 0,45$
LSPN564	$31,93 \pm 0,71$
LSPN565	$32,12 \pm 0,11$

LSPN566	$31,56 \pm 0,01$
LSPN578	$31,66 \pm 0,57$
LSPN579	$32,09 \pm 0,18$
LSPN580	$31,94 \pm 0,08$
LSPN585	$31,98 \pm 0,24$
LSPN572	$32,01 \pm 0,39$
LSPN573	$32,45 \pm 0,21$
LSPN852	$33,01 \pm 0,26$
LSPN853	$32,66 \pm 0,49$
LSPN855	$31,91 \pm 0,28$
LSPN856	$31,55 \pm 0,01$
LSPN857	$31,45 \pm 0,25$
LSPN858	$31,94 \pm 0,11$
LSPN838	$32,02 \pm 0,76$
LSPN839	$32,65 \pm 0,42$
LSPN547	$31,90 \pm 0,26$
LSPN548	$31,81 \pm 0,36$
LSPN961	$33,24 \pm 0,91$

LSPN960

 $31,95 \pm 0,26$

LSPN859

 $32,20 \pm 0,01$

As figuras abaixo (10-17) mostram a representação gráfica da relação entre concentração do inibidor (μM) e a porcentagem de inibição dos candidatos mais promissores de acordo com os testes de atividade ATPase e DSF.

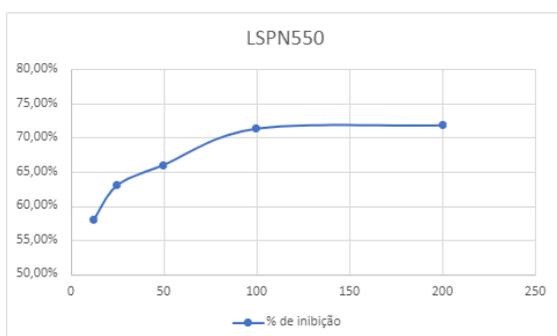


Figura 10. Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN550] (μM)

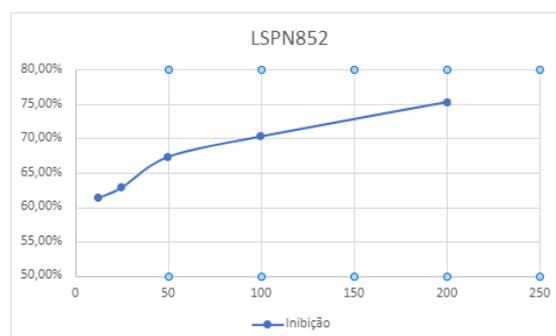


Figura 11. Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN852] (μM)

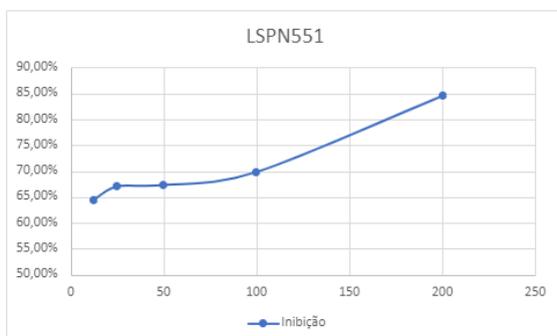


Figura 12. Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN551] (μM)

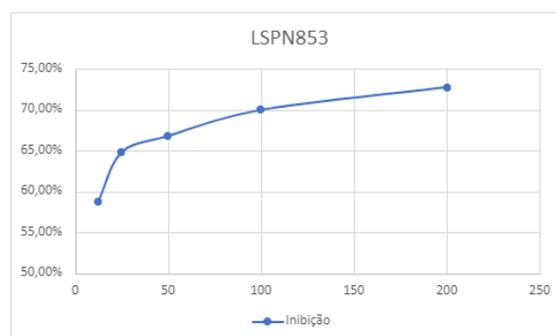


Figura 13. Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN853] (μM)

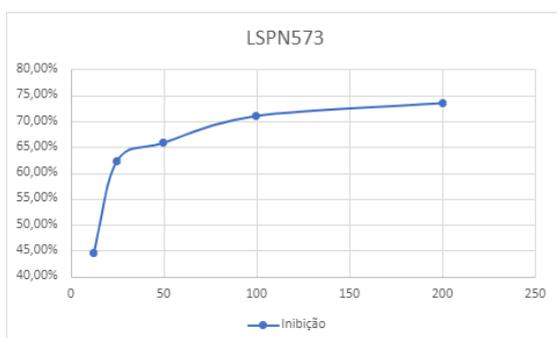


Figura 14. Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN573] (μM)

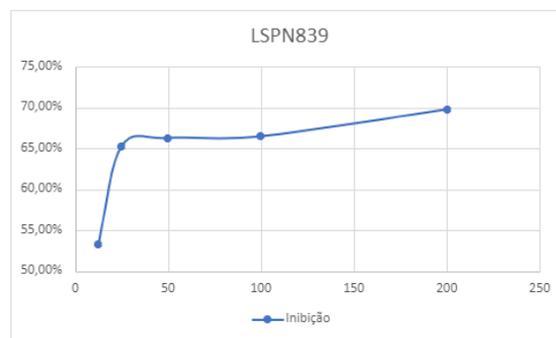


Figura 15. Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN839] (μM)

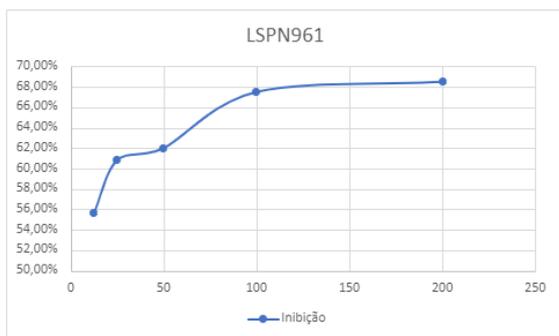


Figura 16. Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN961] (μM)

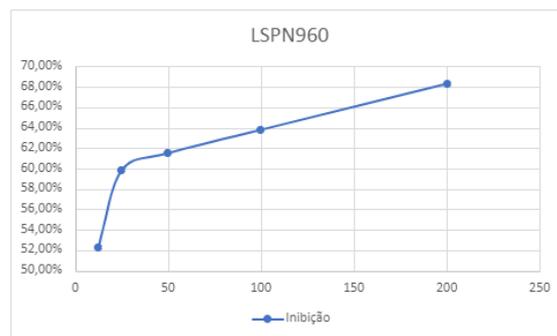
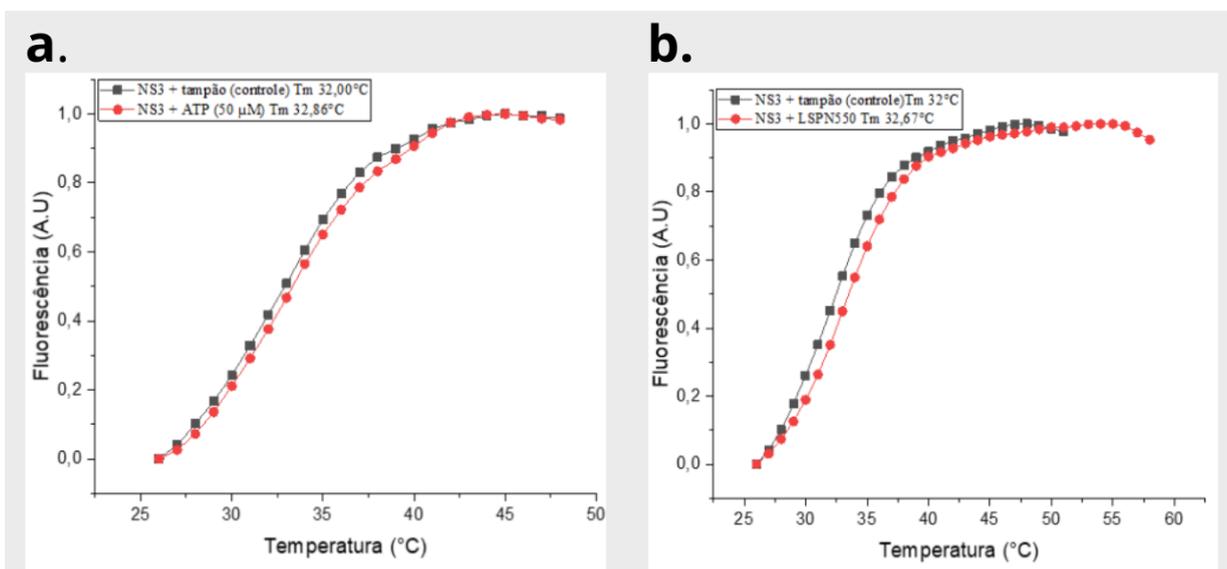
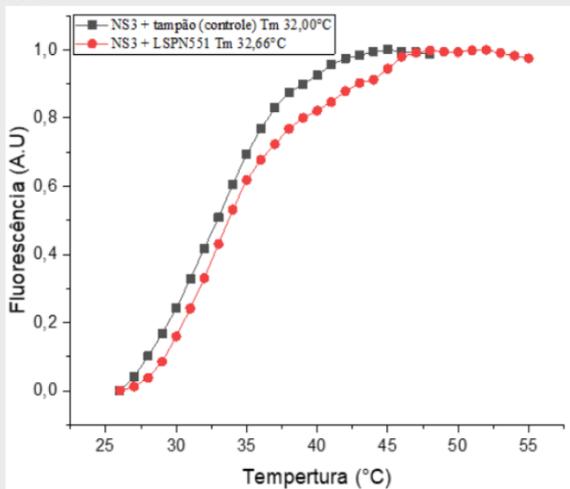
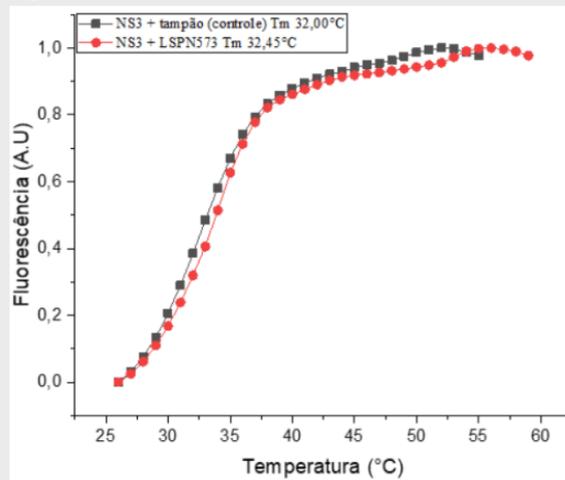
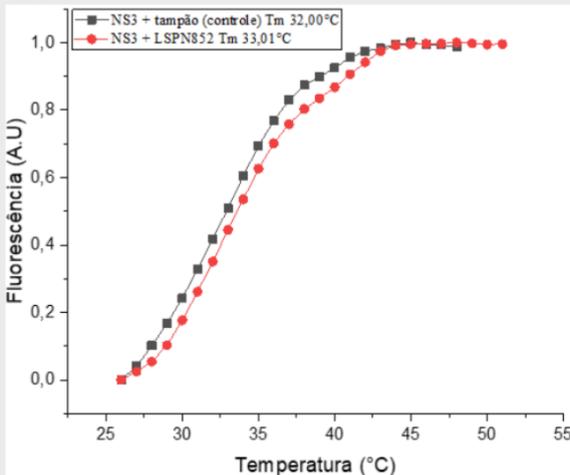
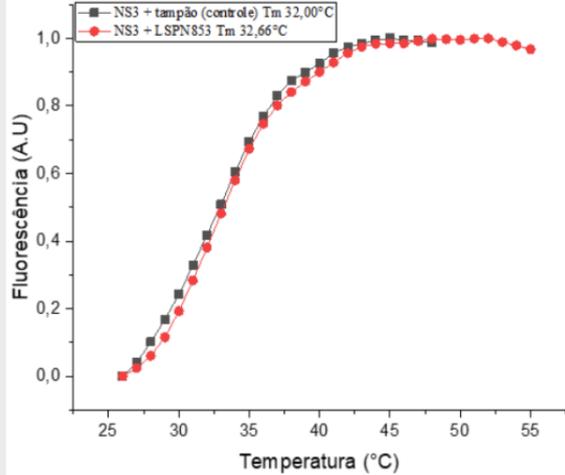
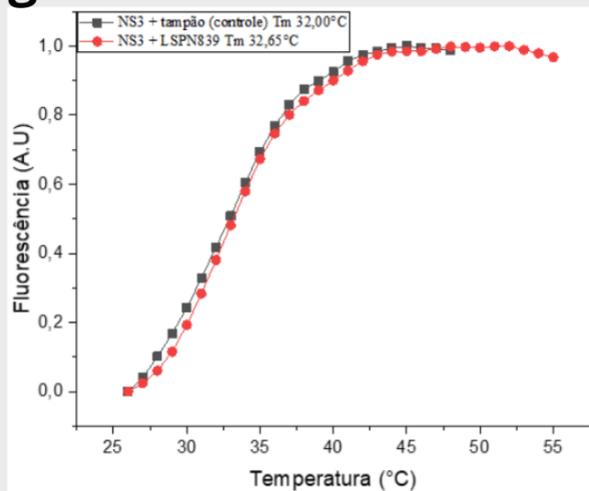
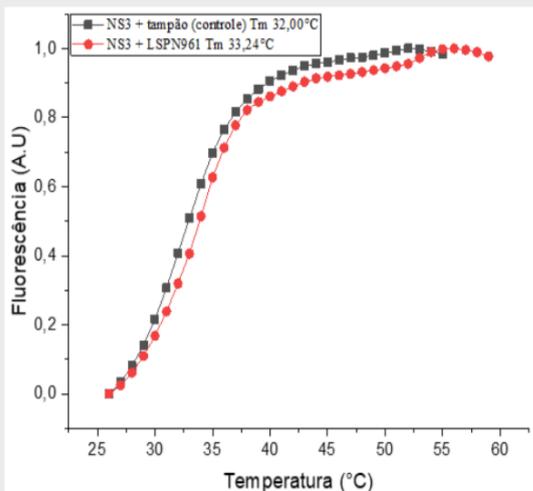


Figura 17. Gráfico: porcentagem de inibição x [LSPN960] (μM)

A avaliação da potencial capacidade inibitória dos compostos selecionados pôde também ser avaliada através das curvas sigmoidais obtidas do ensaio de DSF, as quais apresentam um overlay entre controle (proteína + tampão) e proteína + ligante (Figura 10). Observou-se que houve um aumento sutil na T_m e consequente deslocamento horizontal da curva sigmoidal para a direita na presença dos compostos, indicando aumento na estabilidade térmica conforme houve “binding affinity” entre proteína-composto testado.



c.**d.****e.****f.****g.****h.**

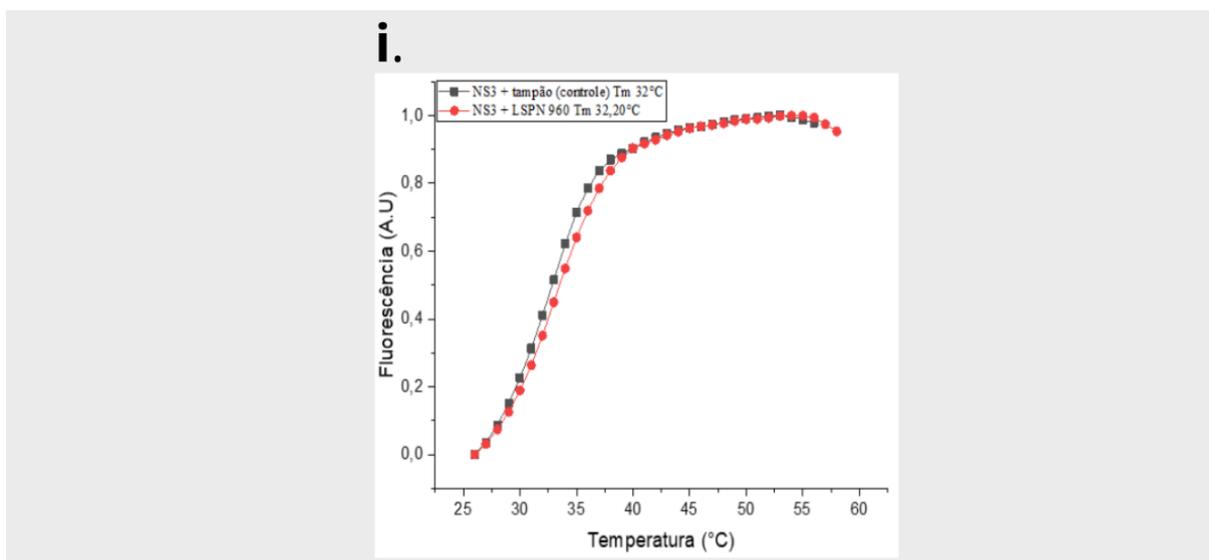


Figura 18. Gráfico do deslocamento na varredura (DSF) em comparação com o controle: **a.** Controle-ATP; **b.** NS3+LSPN550; **c.** NS3+LSPN551; **d.** NS3+LSPN573; **e.** NS3+LSPN852; **f.** NS3+LSPN853; **g.** NS3+LSPN839; **h.** NS3+LSPN961; **i.** NS3+LSPN960

Esses indicativos sugerem que, possivelmente, 6 dos compostos triados via atividade ATPásica bem como pelo DSF são promissores inibidores para NS3^{Hel}. Deve-se notar que para dois compostos, LSPN960 e LSPN961, a seletiva dos testes de atividade ATPásica juntamente com o ensaio de DSF não corroboram como para os demais compostos classificados como promissores. Apesar disso, não se descarta a hipótese deles serem promissores. Uma vez que a triagem via DSF registrou um aumento na T_m, indicando aumento da estabilidade térmica, tais compostos podem, possivelmente, interagir com NS3^{Hel} em seu sítio de helicase, pois trata-se de uma helicase bifuncional. Já que a NS3^{hel} possui atividade de desenovelamento de duplexes de RNA e utiliza a energia obtida pela hidrólise do ATP para translocação na fita no decorrer do processo, os compostos LSPN960 e LSPN961 podem atuar inibindo essa função. Mesmo assim, todos os compostos serão testados frente à capacidade de inibição da atividade helicásica de NS3^{Hel}, assim que esse ensaio for estabelecido pelo grupo.

Contudo, nota-se que a alteração e deslocamento na T_m é baixa, até mesmo quando comparado à proteína com ATP. Isso pode ser explicado pela hipótese de que a maioria das helicases passam por uma alteração na mudança conformacional e alternam entre suas formas aberta e fechada quando ocorre a ligação do ATP ao sítio ATPase e, posteriormente, transloca no decorrer da fita de RNA exercendo sua função de helicase

utilizando-se da energia obtida pela hidrólise do ATP. O ciclo entre as duas formas é necessário e pode haver diferenças entre elas no padrão de ligação ao substrato ²⁰.

Fica evidente que os esforços do grupo no âmbito da busca por moléculas bioativas contra ZIKV tem-se mostrado positiva e que este trabalho gerou resultados satisfatórios que guiarão o planejamento de novas sínteses de acordo com as moléculas promissoras descritas. Além disso, novos ensaios explorando a capacidade inibitória serão elucidados tais como de atividade de desenovelamento de duplexes de RNA, soaking, dentre outras. Perspectivas futuras incluem a triagem de mais compostos conforme fornecidos pela Profa. Dra. Arlene, além de outros compostos existentes na biblioteca do CIBFar.

5. Conclusão

A triagem inicial de 28 compostos por análise da atividade ATPase resultou na identificação de 17 compostos promissores com percentual de inibição acima de 70%. Desses 17 compostos, 11 deles apresentaram exclusivamente inibição da atividade ATPásica, sem confirmação por DSF e, para os outros 6, os resultados dos testes de DSF corroboram a hipótese de que eles apresentam atividade inibitória sobre o sítio ATPase.

Referências Bibliográficas

1. KLEMA, Valerie; PADMANABHAN, Radhakrishnan; CHOI, Kyung. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4640–4656, 2015.
2. WANG, Anyou; THURMOND, Stephanie; ISLAS, Leonel; *et al.* Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2017.
3. JAIN; COLOMA; GARCÍA-SASTRE; *et al.* Structure of the NS3 helicase from Zika virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 8, p. 752–754, 2016.
4. FAUCI, Anthony S.; MORENS, David M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.
5. MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.
6. Toledo K-(Agência F). 2018. USP e empresa apoiada pelo PIPE desenvolvem teste que detecta infecção anterior pelo vírus Zika.
7. PHOO, Wint Wint; LI, Yan; ZHANG, Zhenzhen; *et al.* Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 2016.
8. LI, Zhong; BRECHER, Matthew; DENG, Yong-Qiang; *et al.* Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. **Cell Research**, v. 27, n. 8, p. 1046–1064, 2017.
9. FANG, Jin'e; LI, Huan; KONG, Dexin; *et al.* Structure-based discovery of two antiviral inhibitors targeting the NS3 helicase of Japanese encephalitis virus. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.
10. MASTRANGELO, E.; PEZZULLO, M.; DE BURGHGRAEVE, T.; *et al.* Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1884–1894, 2012.
11. XIE, X., KUM, D. B.; *et al.* A Single-Dose Live-Attenuated Zika Virus Vaccine with Controlled Infection Rounds that Protects against Vertical Transmission. *Cell Host & Microbe*, 24(4). 2018.

12. TIAN, Hongliang; JI, Xiaoyun; YANG, Xiaoyun; *et al.* The crystal structure of Zika virus helicase: basis for antiviral drug design. **Protein & Cell**, v. 7, n. 6, p. 450–454, 2016.
13. LI, L.; WANG, J.; JIA, Z.; *et al.* Structural view of the helicase reveals that Zika virus uses a conserved mechanism for unwinding RNA. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 74, n. 4, p. 205–213, 2018.
14. CAO; LI; JIN; *et al.* Molecular mechanism of divalent-metal-induced activation of NS3 helicase and insights into Zika virus inhibitor design. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 21, p. 10505–10514, 2016.
15. KUMAR, D., SHARMA, N.; *et al.* Mechanistic insights into zika virus NS3 helicase inhibition by epigallocatechin-3-gallate. *ACS Omega*, 2020.
16. DEVNARAIN, N., SOLIMAN, M. E; *et al.* Molecular mechanism of resveratrol inhibition of Zika virus NS3 helicase: Behind the scenes. **Future Virology**, 14(2), 73–84, 2019.
17. SALAM, Kazi Abdus; FURUTA, Atsushi; NODA, Naohiro; *et al.* Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase by Manoalide. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 650–654, 2012.
18. BASU, Rupsa; TUMBAN, Ebenezer. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, 2016.
19. SHU, Ting; HUANG, Muhan; WU, Di; *et al.* SARS-Coronavirus-2 Nsp13 Possesses NTPase and RNA Helicase Activities That Can Be Inhibited by Bismuth Salts. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 3, p. 321–329, 2020.
20. JANG, Kyoung-Jin; JEONG, Seonghwan; KANG, Dong Young; *et al.* A high ATP concentration enhances the cooperative translocation of the SARS coronavirus helicase nsP13 in the unwinding of duplex RNA. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
21. NIESEN, F.H; BERGLUND H.; *et al.* The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nat Protoc**, 2007.
22. LIMA, Caroline Sprengel; MOTTIN, Melina; ASSIS, Leticia Ribeiro de; MESQUITA, Nathalya Cristina de Moraes Roso; SOUSA, Bruna Katiele de Paula; COIMBRA, Lais Durco; SANTOS, Karina Bispo-dos-; ZORN, Kimberley M.; GUIDO, Rafael V.C.; EKINS, Sean. Flavonoids from *Pterogyne nitens* as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 109, p. 104719, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104719>.

23. MOTTIN, Melina; CAESAR, Lindsay K.; BRODSKY, David; MESQUITA, Nathalya C.M.R.; OLIVEIRA, Ketlyn Zagato de; NOSKE, Gabriela Dias; SOUSA, Bruna K.P.; RAMOS, Paulo R.P.s.; JARMER, Hannah; LOH, Bonnie. Chalcones from *Angelica keiskei* (ashitaba) inhibit key Zika virus replication proteins. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 120, p. 105649, mar. 2022.
24. FERNANDES, R. S., NOSKE, G. D., GAWRILJUK, V. O., DE OLIVEIRA, K. I. Z., Godoy, A. S., Mesquita, N. C. M. R., Oliva, G. High-throughput Antiviral Assays to Screen for Inhibitors of Zika Virus Replication. *J. Vis. Exp.* (176), e62422, doi:10.3791/62422 (2021).
25. Rosetta™ 2(DE3) Singles™ Competent Cells - Novagen, MERCK, 2021. Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Rosetta-2DE3-Singles-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-71400>. Acesso em: 10, setembro, 2022.
26. STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 2005.
27. STUDIER, F. W. Stable Expression Clones and Auto-Induction for Protein Production in *E. coli* . In: Chen, Y. (eds) Structural Genomics. *Methods in Molecular Biology*, vol 1091. Humana Press, Totowa, NJ, 2014.