

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ALISSON FELIPE DE OLIVEIRA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR, DE HOMOLOGIA E
ANCORAMENTO DE PROTEÍNAS DEAD-BOX DDX3 PARA FINS DE
DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS ANTIVIRAIS**

Uruguaiiana, RS

2018

ALISSON FELIPE DE OLIVEIRA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR, DE HOMOLOGIA E
ANCORAMENTO DE PROTEÍNAS DEAD-BOX DDX3 PARA FINS DE
DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS ANTIVIRAIS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Favero Reisdorfer Paula

Uruguaiana, RS

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do

Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

D46e DE OLIVEIRA, ALISSON FELIPE
ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR, DE HOMOLOGIA E ANCORAMENTO
DE PROTEÍNAS DEAD-BOX DDX3 PARA FINS DE DESENVOLVIMENTO DE
COMPOSTOS ANTIVIRAIS / ALISSON FELIPE DE OLIVEIRA.
72 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2018.

"Orientação: Favero Reisdorfer Paula".

1. MODELAGEM MOLECULAR. 2. HOMOLOGIA E ANCORAMENTO DE
PROTEÍNAS. 3. DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS ANTIVIRAIS. I.
Título.

ALISSON FELIPE DE OLIVEIRA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR, DE HOMOLOGIA E
ANCORAMENTO DE PROTEÍNAS DEAD-BOX DDX3 PARA FINS DE
DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS ANTIVIRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia.

Dissertação defendida e aprovada em: 20 de dezembro de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula
Orientador
(UNIPAMPA)

Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos
Da Silva
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&codigo_verificador=0914780&codigo_crc=8A288D85&hash_... 1/2 06/09/2022 15:40 SEI/UNIPAMPA - 0914780 - SISBI/Folha de Aprovação

(UNIPAMPA)



Assinado eletronicamente por **MARCELO DONADEL MALESUIK, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/09/2022, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as norma vas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **FAVERO REISDORFER PAULA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 02/09/2022, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as norma vas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **FABIANA ERNESTINA BARCELLOS DA SILVA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/09/2022, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as norma vas legais aplicáveis.



A auten cidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0914780** e o código CRC **8A288D85**.

https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&codigo_verificador=0914780&codigo_crc=8A288D85&hash_... 2/2

“A liberdade, que é uma conquista, e não uma doação, exige permanente busca. Busca permanente que só existe no ato responsável de quem a faz. Ninguém tem liberdade para ser livre: pelo contrário, luta por ela precisamente porque não a tem. Ninguém liberta ninguém, ninguém se liberta sozinho, as pessoas se libertam em comunhão”. (FREIRE, 1987).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais que continuamente me instigaram a buscar novos aprendizados.

Ao meu Orientador Professor Fávero por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e ter concedido a oportunidade de me tornar mestre. Agradeço por acreditar em meu potencial, pela compreensão com meus atrasos e por todo o conhecimento durante esses dois anos.

Aos meus amigos especialmente os de Uruguaiana por terem me amparado em momentos difíceis desempenhando o papel de segunda família.

Aos professores da banca que aceitaram participar e colaborar com sugestões que contribuíram significativamente para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores do PPG que contribuíram para o meu crescimento como pesquisador, que estimularam um estudo intensivo de muito aprendizado e práticas docentes.

A todos que acreditaram, torceram por mim e contribuíram para a realização desta pesquisa, o meu agradecimento.

RESUMO

O surgimento de múltiplas cepas resistentes a fármacos são um risco de falha na terapia antiviral. Em consequência dessa condição, existe a necessidade de identificar fármacos novos que possam ser utilizados contra esses patógenos no desenvolvimento de agentes terapêuticos seguros e efetivos. Estudos recentes sugerem que cofatores celulares estão envolvidos em etapas importantes da replicação viral. O DEAD-box RNA helicase DDX3 é uma enzima humana que interage com proteínas codificadas por alguns vírus, e que a usam para favorecer a sua replicação. No presente trabalho, realizamos estudos de modelagem de homologia de proteínas e ancoramento molecular, predição de toxicidade e de bioatividade de compostos candidatos a antivirais. Uma vez que a estrutura tridimensional de DDX3 humana em sua conformação fechada não está disponível experimentalmente, DDX3 foi predita por modelagem de homologia a partir da ferramenta MODELLER 9v20, utilizando múltiplos modelos. A minimização de energia de proteína modelada foi feita usando os softwares Chimera 1.10.1 e validada pelo gráfico de Ramachandran com 99.7% de resíduos de DDX3 na região permitida, sendo que o fator de qualidade geral foi de 78.247 usando o software ERRAT o que resultou em dados validados por suas qualidades estereoquímicas. O modelo protéico foi utilizado para ancoragem dos compostos tidiazuron e cetoprofeno inibidores potenciais da DDX3 utilizando o software Autodock 4.2. Curiosamente, entre os resíduos de ligação de ambos os compostos estão a PHE 357 e o THR 323. Estes resíduos desempenham papel fundamental na atividade dos inibidores da DEAD-BOX DDX3. Assim, este estudo fornece mais informações sobre as relações inibitórias da helicase DDX3 e abre caminhos para a concepção de estratégias eficazes para superar a resistência aos antivirais ao inibir a replicação de vírus que utilizam cofatores celulares. Além disso, os perfis de bioatividade como o “*druglikeness*”, “*drugscore*” e filtro de propriedades físico-químicas da regra dos cinco de Lipinski, desses compostos resultaram em valores promissores e, portanto, esses potenciais agentes inibidores podem ser tomados em estudos pré-clínicos e clínicos como terapia antiviral.

Palavras-chave: Modelagem de homologia, DEAD BOX DDX3, predição de bioatividade e propriedades físico-químicas, ancoramento molecular, antivirais.

ABSTRACT

The emergence of multiple drug-resistant strains poses a risk of failure in antiviral therapy. As a result of this condition, there is a need to identify new drugs that can be used against these pathogens in the development of safe and effective therapeutic agents. Recent studies suggest that cellular cofactors are involved in important steps of viral replication. The DEAD-box RNA helicase DDX3 is a human enzyme that interacts with proteins encoded by some viruses, and that use it to favor their replication. In the present work, we carried out studies of protein homology modeling and molecular anchoring, toxicity and bioactivity prediction of antiviral candidate compounds. Since the three-dimensional structure of human DDX3 in its closed conformation is not experimentally available, DDX3 was predicted by homology modeling using the MODELLER 9v20 tool, using multiple models. The energy minimization of the modeled protein was done using Chimera 1.10.1 software and validated by the Ramachandran plot with 99.7% of DDX3 residues in the allowed region, and the overall quality factor was 78,247 using the ERRAT software which resulted in data validated for their stereochemical qualities. The protein model was used to anchor the compounds tidiazuron and ketoprofen potential inhibitors of DDX3 using Autodock 4.2 software. Interestingly, among the binding residues of both compounds are PHE 357 and THR 323. These residues play a fundamental role in the activity of DEAD-BOX DDX3 inhibitors. Thus, this study provides more information about the DDX3 helicase inhibitory relationships and opens the way for the design of effective strategies to overcome antiviral resistance by inhibiting the replication of viruses that use cellular cofactors. In addition, bioactivity profiles such as the “druglikeness”, “drugscore” and physicochemical properties filter of Lipinski's rule of five, of these compounds resulted in promising values and, therefore, these potential inhibitory agents can be taken in pre-clinical studies. -clinical and clinical as antiviral therapy.

Keywords: Homology modeling, DEAD BOX DDX3, prediction of bioactivity and physicochemical properties, molecular anchoring, antivirals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura química do cetorolaco e do composto 2 inibidores da DDX3 humana.....27
- Figura 2.** Estrutura 3D das conformações adotadas por DDX3. (A) Pré-conformação de ligação ao RNA (PDB: 5E7I), (B) conformação fechada (PDB: 2DB3).....59
- Figura 3.** Alinhamento de múltiplas sequências geradas para o modelo 3D usando o software ClustalOmega.....27
- Figura 4.** Modelo final obtido por modelagem de homologia, da DDX3 na conformação fechada.....27
- Figura 5.** Gráfico de Ramachandran da DDX3h obtido por PROCHECK 3D, mostrando os ângulos diédricos Psi e Phi de resíduos de aminoácidos. a.....27
- Figura 6.** Gráfico da associação entre a estrutura 3D e a sequencia de aminoácidos em 1D para DDX3h gerado pelo software Verify 3D.....27
- Figura 7.** Fator de qualidade global realizada por ERRAT27
- Figura 8.** Estrutura secundária da DDX3 modelada. Aqui, hélice, fios estendidos e voltas beta são indicados por azul, vermelho e verde, respectivamente.....27
- Figura 9.** Modelos de interação DDX3h-ligante molecular do cetoprofeno no local do sítio ativo.....27

Figura 10. Modelos de interação DDX3h-ligante molecular do tidiazuron no local do sítio ativo.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da pesquisa de sequências de proteínas com o uso do BLAST.....	15
Tabela 2. Valores de pontuação DOPE dos modelos 3D da DDX3 gerados.....	16
Tabela 3. Valores de pontuação DOPE dos modelos 3D da DDX3 gerados com o uso de software Modeller.....	22
Tabela 4. Estatísticas da Análise de Ramachandran (Gráfico) do modelo DDX3h	22
Tabela 5. Elementos de estrutura secundária da DDX3h calculada pelo software SOPMA.....	22
Tabela 6. Resultados de interação do tidiazuron com o modelo DDX3h	22
Tabela 7. Resultados de interação do cetoprofeno com o modelo DDX3h	22
Tabela 8. Propriedades físico-químicas calculadas com o uso de software Molinspiration Chemoinformatics.....	22
Tabela 9. Propriedades de previsão dos riscos de toxicidade calculadas com o uso de software Osiris	22
Tabela 10. Pontuação de avaliação da bioatividade calculada pelo software Molinspiration Chemoinformatics.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D - Unidimensional

3D – Tridimensional

AA- Ácido araquidônico

AINE - Anti-inflamatório não esteroidal

ATP – Trifosfato de Adenosina

BLAST – Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local

cLogS – Coeficiente de Solubilidade

CMV – Citomegalovírus

COX – Ciclooxigenase

COX-1- Ciclooxigenase isoenzima 1

COX-2- Ciclooxigenase isoenzima 2

DDX1 – Helicase de RNA dependente de ATP DDX1

DDX3 – Helicase de RNA dependente de ATP DDX3

DDX3h- Helicase de RNA dependente de ATP homóloga

DDX3X- Helicase de RNA dependente de ATP ligada ao cromossomo X

DDX3Y- Helicase de RNA dependente de ATP ligada ao cromossomo Y

DDX5 - Helicase de RNA dependente de ATP DDX5

DENV – Vírus da Dengue

DFT - Density Functional Theory

DHX9 - RNA helicase A

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DOPE – Energia Protéica Discreta Otimizada

GA - Algoritmo genético

GRID- Caixa de grade

HA – Número de Aceptores de Hidrogênio

HCV – Hepatite C

HD – Número de Doadores de Hidrogênio

HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana subtipo 1

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IE – Inibidor Enzimático

IEBP3 - Interleucina fator vinculativo potenciador 3

IGF2BP1 - Proteína de ligação a RNAm factor 2 de crescimento semelhante a insulina

IP – Inibidor de Protease

IQ – Inibidor de Quinase

IRF3 - Fator regulatório de interferon 3

Ki – Constante de Inibição

kcal/mol – Quilocaloria por mole

LGA - Algoritmo Genético Lamarckiano

LGPCR – Ligante de Receptor Acoplado a Proteína G

LogP – lipofilicidade

LRN – Ligante do Receptor Nuclear

MCI – Modulador de Canais Iônicos

mRNA - Ácido Ribonucléico mensageiro

nrotb – Número de rotações

NS3 – Proteína Não Estrutural 3

PABP-1 - Proteína de ligação de poliadenilato 1

PDB – Protein Data Bank

PGs- Prostaglandinas

PHE - Fenilalanina

PM – Peso Molecular

QSAR - Quantitave Structure-Activity Relationship

REA – Relações Estrutura-Atividade

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido Ribonucléico

SOPMA – Self-Optimized Prediction Method

TDZ – Tidiazuron

THR – Treonina

TPSA – Área de Superfície Polar Molecular

UniprotKB – The Uniprot Knowledgebase

VDW - Van der Waals

VNO – Vírus do Nilo Ocidental

YBX1 - Proteína de ligação Y-box

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Antivirais.....	17
3.2 A enzima DDX3.....	18
3.3 Planejamento e modelagem molecular de compostos bioativos novos.....	20
3.4 Tidiazuron.....	22
3.5 Cetoprofeno.....	23
3.4 Modelagem por homologia.....	23
4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
5 MANUSCRITO.....	28
6 DISCUSSÃO GERAL.....	60
7 CONCLUSÃO.....	62
8 PERSPECTIVAS.....	63
9 REFERÊNCIAS.....	64
10 ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Os vírus são agentes conhecidos como parasitas intracelulares obrigatórios cujo ciclo de vida e processos de replicação, expressão proteica e montagem de partículas progênicas dependem de mecanismos metabólicos da célula hospedeira. Esses agentes codificam proteínas virais capazes de interagir com as proteínas hospedeiras, explorando funções celulares a seu favor (BRAI et al., 2016; GARBELLI et al., 2011). Os vírus podem ser patogênicos ou não patogênicos aos seres humanos.

A abordagem terapêutica mais utilizada no combate a doenças virais tem como alvo atingir diretamente enzimas ou componentes estruturais de um determinado vírus. O tratamento da infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) utiliza compostos inibidores de algumas de suas proteínas, como a transcriptase reversa e protease HIV-viral. No entanto, antivirais de ação direta podem tornar-se ineficazes frente às cepas resistentes devido a ocorrência de mutação, como é observado em casos com vírus de RNA, que tendem a exibir altas taxas de mutação (BRAI et al., 2016; RADI et al., 2012).

Estudos recentes têm relatado diversos fatores do hospedeiro, como enzimas, receptores, organelas, que são importantes para a replicação de alguns vírus. Nesta perspectiva, cofatores celulares envolvidos na reprodução de vírus representam uma abordagem terapêutica promissora na pesquisa de substâncias com atividade antiviral (ARHEL; KIRCHHOFF, 2010; FAZI et al., 2015). Neste contexto, uma vez que as proteínas celulares são menos propensas a sofrer mutações do que as virais, esse mecanismo de ação pode ser explorado para direcionar candidatos a fármacos antivirais a alvos proteicos do hospedeiro. Este cenário pode tornar mais difícil a ocorrência de resistência aos medicamentos (TINTORI et al., 2014).

O polipeptídeo Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD-box) 3 (DDX3X) ligada ao cromossomo X, pertence a uma grande família de helicases de RNA dependentes de ATP conhecidas como a família de proteínas DEAD-box. A DDX3X é expressa em ampla gama de tecidos e está envolvida em processos biológicos chave como a progressão do ciclo celular, resposta imune inata e apoptose, indicando o papel universal da DDX3 na homeostase celular. É destacada sua presença em disfunções que resultam no desenvolvimento de tumores e também no ciclo de replicação de agentes etiológicos, como os pertencentes a diferentes famílias: Citomegalovírus – CMV (Herpesviridae), Vírus da Imunodeficiência Humana subtipo 1 – HIV-1 (Retroviridae); Hepatite C – HCV (Flaviviridae), incluindo as arboviroses causadas pelos flavivírus da Encefalite Japonesa, Dengue e Vírus do Nilo Ocidental – VNO (Flaviviridae) que constituem

uma prioridade da saúde pública pois não há terapia antiviral aprovada para o tratamento dessas infecções; Vírus Vacínia (Poxviridae) e Norovirus (Caliciviridae). Diante do exposto, a DDX3 tem sido descrita como um importante alvo para a prospecção de novos antivirais (BRAI et al., 2016; NOBLE et al., 2012; SAMAL et al., 2015; VALIENTE-ECHEVERRÍA; HERMOSO; SOTO-RIFO, 2015).

A abordagem que investiga alvos os fatores celulares do hospedeiro, deve considerar se os mesmos podem ser essenciais para o vírus e ao mesmo tempo dispensáveis para o metabolismo da célula (GARBELLI et al., 2011). Neste contexto, em estudo realizado por Radi *et al.* (2012) alguns resultados foram obtidos ao inibir a ligação do RNA no sítio ativo da DDX3, o que resultou em inibição do crescimento celular, prejudicando assim a replicação do HIV-1, aliados à baixa toxicidade em testes pré-clínicos. Da mesma forma, Brai *et al.* (2016) validaram em seu estudo a DDX3 como um alvo farmacêutico, ao obter inibidores visando o seu sítio de ligação ao RNA. Sendo assim, a inibição de RNA helicases individuais como rota terapêutica, está sendo explorada atualmente.

Numerosas sequências da helicase DDX3 humana foram depositadas em bancos de dados de sequência de proteínas. As proteínas DEAD-box contêm dois domínios conservados que contribuem para a ligação de RNA e ATP, a ativação do sítio de ligação do RNA envolve a transição de estados conformacionais em aberta, pré-ligação de RNA e conformação fechada. A ligação de RNA completa ocorre com o fechamento da fenda, ou seja, na conformação fechada da helicase DDX3 (SCHÜTZ et al., 2010). Contudo, até o momento, uma estrutura tridimensional da conformação fechada determinada experimentalmente não está disponível, inviabilizando estudos de potenciais inibidores da ligação do RNA. Desta forma, a estrutura 3D da DDX3 humana ligada ao RNA (conformação fechada) foi obtida por modelagem de homologia neste trabalho.

Com base no proposto neste trabalho, a inibição de DDX3 por uma molécula pequena pode ser explorada para o desenvolvimento de um agente antiviral de amplo espectro para uso humano e também aplicação em doenças que acometem animais. Nesta pesquisa, empregamos modelos experimentais *in silico* para sugerir que os compostos tidiazuron e cetoprofeno, selecionados com base na semelhança estrutural com inibidores sintéticos da DDX3 existentes (BRAI et al., 2016; SAMAL et al., 2015), formam interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da DDX3, podendo ser direcionados como candidatos potenciais com atividade inibitória dessa helicase.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Estudar e obter modelos de DDX3 e de interação dos compostos com promissora atividade antiviral, cetoprofeno e o derivado ariluréia tidiazuron, com o sítio ativo da helicase DDX3;

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção de uma estrutura tridimensional da DDX3 humana, em sua conformação fechada, através do método de modelagem de homologia;

- Realizar estudos virtuais de ancoramento molecular entre a enzima DDX3 modelada e os compostos estudados como potenciais inibidores;

- Avaliar as propriedades físico-químicas dos compostos estudados;

- Avaliação da predição da bioatividade dos compostos estudados;

- Avaliação da predição da toxicidade dos compostos estudados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Antivirais

Vírus são organismos biológicos acelulares de estrutura simples que necessitam de uma célula hospedeira para se multiplicarem. Seus genomas são constituídos por fita simples ou dupla de RNA (ácido ribonucléico) ou DNA (ácido desoxirribonucléico), além de capsídeo proteico que pode ser revestido por envelope ou capa lipídica. Os vírus podem ser classificados de acordo com o tipo de ácido nucléico que possuem, das características do sistema que os envolvem, ou ainda do tipo de células que infectam. A incidência de enfermidades causadas por vírus atinge a humanidade e animais no mundo inteiro (BEKERMAN; EINAV, 2015; LOU; SUN; RAO, 2014). Sendo assim, estudos que visam o controle de propagação e manifestação de tais doenças, além da inativação destes patógenos, são de grande interesse em saúde pública por representarem ameaça importante.

A família *Flaviviridae* é constituída de diversos gêneros de vírus patogênicos, como Hepacivirus (Hepatite C), Flavivirus (Dengue do tipo I - IV, Zika, Vírus da Febre Amarela, e da Febre do Oeste do Nilo), Pegivirus, e Pestivirus (vírus da diarreia viral bovina I e II e da febre porcina) (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Neste cenário, muitos vírus desta família são transmitidos por insetos para mamíferos, o que tem gerado preocupação na população exposta a estes vetores.

O mecanismo de infecção e replicação molecular dos vírus é complexo uma vez que utiliza as estruturas celulares para esta finalidade. Alguns da família *Flaviviridae*, gênero pestivirus, apresentam uma protease viral, a N-terminal Npro, que neutraliza defesas antivirais celular através da inibição do fator regulatório de interferon 3 (IRF3). Esta proteína também promove interação com mais de 55 proteínas associadas, principalmente proteínas ribossomais e ribonucleoproteínas, incluindo RNA helicase A (DHX9), proteína de ligação Y-box (YBX1), DEAD-box RNA helicases DDX3 e DDX5, proteína de ligação a RNAm factor 2 de crescimento semelhante a insulina (IGF2BP1), proteína tumor mieloma múltiplos 2, interleucina fator vincutivo potenciador 3 (IEBP3), proteína de ligação ao nucleótido guanina 3, e proteína de ligação de poliadenilato 1 (PABP-1) do hospedeiro (BRAI et al., 2016; JEFFERSON et al., 2014).

A maioria das abordagens terapêuticas atuais usadas para o tratamento de infecções virais e das doenças causadas por estes envolve o uso de substâncias que atuam diretamente em

alvos do vírus ou das organelas, proteínas ou ácidos nucleicos da célula hospedeira. Embora terapeuticamente bem sucedidos, muitos podem perder a eficiência devido ao surgimento de resistência aos medicamentos, ou apresentam efeitos tóxicos (BEKERMAN; EINAV, 2015; LOU; SUN; RAO, 2014). Além disso, poucos antivirais considerados de amplo espectro estão disponíveis atualmente (BRAI et al., 2016). A maioria dos fármacos antivirais disponíveis tem atuação como substâncias antiretrovirais.

3.2 A enzima DDX3

A enzima DDX3 pertence a uma grande família de helicases de RNA dependentes de ATP conhecidas como a família de proteínas DEAD-box, possui dois homólogos, DDX3X e DDX3Y, localizados nos cromossomos X e Y, respectivamente. A DDX3X é detectada em diversos tecidos e está envolvida em processos biológicos chave como a progressão do ciclo celular, resposta imune inata e apoptose, inclusive em diferentes etapas do ciclo de replicação de diferentes vírus que exploram a capacidade da DDX3 em montar grandes complexos de ribonucleoproteínas (VALIENTE-ECHEVERRÍA; HERMOSO; SOTO-RIFO, 2015). Esta enzima tem função primordial na regulação de diversos genes e no metabolismo de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) em organismos como o humano, bovino, caprino e de insetos como a *Drosophila melanogaster* (ARIUMI, 2014). Esta enzima apresenta outra isoforma a DDX3Y que também é importante na fisiologia do corpo humano. Na figura 1 observam-se algumas regiões moleculares de ação de suporte da DDX3 humana no processo de assembleia de ribossomas em subfração 80s.

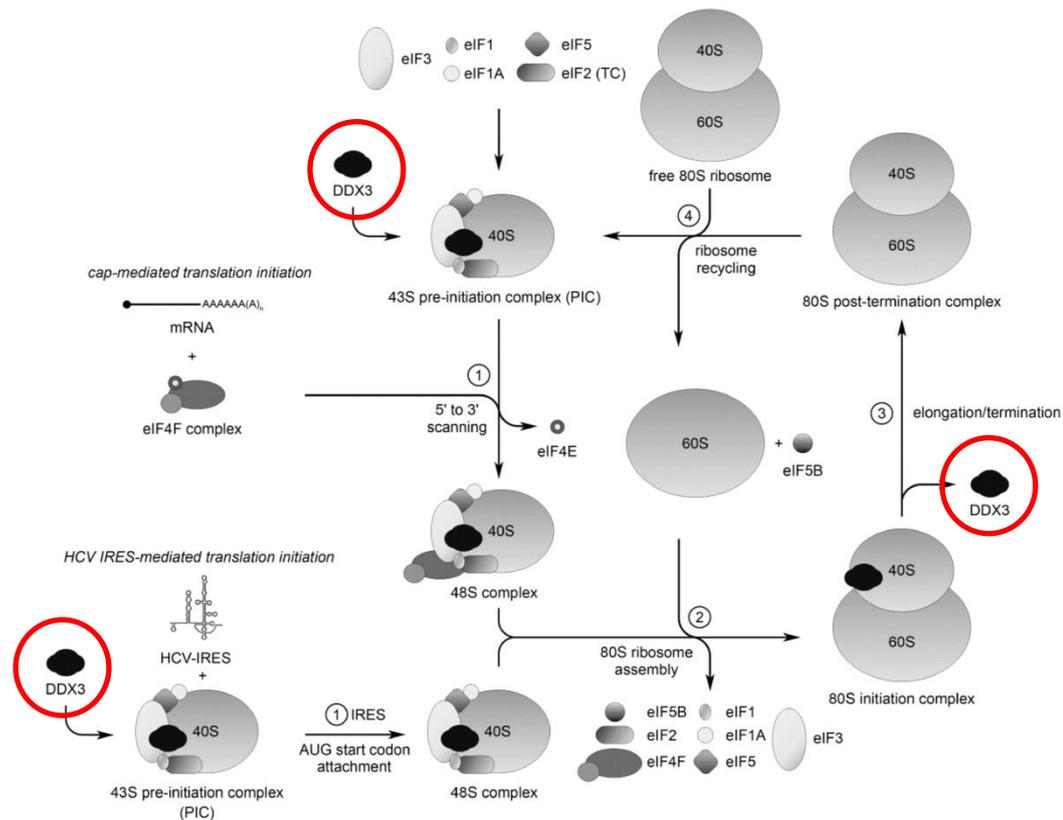


Figura 1. Locais moleculares de atuação da enzima helicase DEAD-Box DDX3 em assembleia de ribossomas 80s. Adaptado de Geissler *et al.* Nucleic Acids Res. 2012;40(11):4998-5011. doi:10.1093/nar/gks070.

A DDX3 tem sido apontada como presente em etapas chave no desenvolvimento de disfunções que resultam no estabelecimento de tumores. Neste cenário, esta proteína pode estar superexpressa e se encontrar envolvida em diversos tipos de câncer, como o epitelial de mama por exemplo (SAMAL *et al.*, 2015). No caso de vírus, tem importância destacada no ciclo de replicação agentes virais com relevante impacto na saúde humana, como os pertencentes a diferentes famílias: CMV (Herpesviridae), HIV-1 (Retroviridae), HCV, Vírus da Encefalite Japonesa, Vírus da Dengue (DENV), Vírus do Nilo Ocidental (WNV; Flaviviridae), Vírus Vacínia (Poxviridae) e Norovirus (Caliciviridae) (BRAI *et al.*, 2016; SAMAL *et al.*, 2015; VALIENTE-ECHEVERRÍA; HERMOSO; SOTO-RIFO, 2015). Através de múltiplos mecanismos a DDX3 promove a replicação desses vírus de RNA, como ocorre no ciclo do HIV, a função da helicase é exportação nuclear e tradução de mRNA sem *splicing* viral (VALIENTE-ECHEVERRÍA; HERMOSO; SOTO-RIFO, 2015). Desta forma, a proteína DDX3 é um alvo terapêutico interessante para o estudo de possíveis candidatos a fármacos que possam atuar como agentes antivirais ao considerar a interação vírus-DDX3. A estrutura em 3D da DDX3 humana depositada no banco de dados Proteín Data Bank sob código 5E7L é demonstrada a seguir:

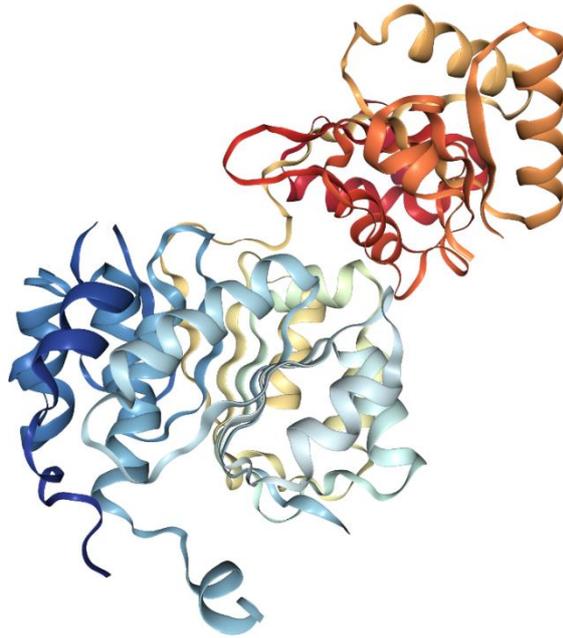


Figura 2. Estrutura cristalizada do sítio ativo catalítico da DEAD-box DDX3 humana.

Não há estudos descritos na literatura que relacionem as substâncias tidiazuron e cetoprofeno com ação de inibição da proteína do hospedeiro DDX3 envolvida na replicação de vírus. Algumas substâncias como os derivados das toluidinúreas (BRAI et al., 2016), e o fármaco cetorolaco tem atividade de inibição da enzima DDX3 humana estabelecida (SAMAL et al., 2015), sendo que o composto 2 tem proposição de atividade antiviral frente a quatro diferentes vírus, HCV, Dengue, da Febre do Oeste do Nilo e HIV. O mecanismo de ação composto 2 (das toluidinúreas) foi avaliado através do teste inibição enzimática frente as enzimas DDX1, NS3 (de Dengue e HCV) e DDX3, sendo esta última a proteína envolvida. Estas substâncias e análogos estruturais, como os compostos selecionados para este estudo (tidiazuron e cetoprofeno), se apresentam como protótipos para o estudo de inibidores de enzima DDX3 com a finalidade de se avaliar o efeito de inibição de replicação viral e para desenvolver fármacos antivirais novos.

3.3 Planejamento e modelagem molecular de compostos bioativos novos

O planejamento de fármacos é o conjunto de ferramentas ou estratégias utilizadas para direcionar a modificação molecular da estrutura química de um determinado composto bioativo com o objetivo de aperfeiçoar a sua atividade biológica e/ou diminuir a sua toxicidade. Estas ferramentas têm como finalidades facilitar a obtenção, alterar as propriedades

físico-químicas para beneficiar o seu uso, facilitar a compreensão sobre o mecanismo de ação e aperfeiçoar o perfil farmacológico de uma molécula bioativa (KHAN et al., 2011). Neste cenário, a modelagem molecular é um conjunto de técnicas computacionais usadas no planejamento de fármacos, que são empregadas para o desenho, à determinação e visualização *in silico* da estrutura química de compostos bioativos, ligantes, e biomacromoléculas alvo, e para a obtenção de suas propriedades físico-químicas estereoelétrônicas e de hidrofobicidade (BARREIRO et al., 1997). Entre as estratégias modernas abordadas no planejamento de fármacos se destacam a abordagem direta e a indireta, sendo a primeira basicamente caracterizada pelo emprego da estrutura química do receptor biológico e a segunda da molécula ativa ou ligante. A abordagem direta abrange os métodos de ancoramento molecular (*molecular docking*), a busca de farmacóforo e triagem virtual baseado na macromolécula alvo e de novo *design*. Já a abordagem indireta engloba o cálculo de propriedades físico-químicas, análise de similaridade estrutural, os estudos qualitativo e quantitativo das relações estrutura-atividade, REA e QSAR (do inglês *quantitative structure-activity relationship*), a busca de farmacóforo e triagem fundamentadas na estrutura química do ligante.

As abordagens da modelagem molecular são estratégias geralmente utilizadas em conjunto, os quais podem ser empregados para identificar e classificar as contribuições da estrutura química, e suas propriedades, sobre a atividade biológica. De posse destes dados é possível delinear as ações a serem realizadas no processo de substituição molecular e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (BARREIRO; FRAGA, 2008). Em outras palavras, as alterações moleculares são efetuadas a partir do conhecimento de quais propriedades físico-químicas e porções estruturais condicionam a ação dos compostos bioativos. Desta forma, é possível se obter subsídios que auxiliam o planejamento e o direcionamento da síntese e obtenção de compostos com atividade antiviral promissora.

A técnica de ancoramento molecular (*molecular docking*) consiste do cálculo da orientação preferencial de uma molécula ativa quando ligada a uma segunda molécula (receptor biológico) para formar um complexo estável. O conhecimento da orientação pode ser usado para prever a intensidade da associação ou afinidade de ligação entre essas duas moléculas usando, neste caso, funções de ranqueamento (*Score*) (ERICKSON et al., 2004). Neste cenário, a associação entre molécula ativa e receptor desempenha uma função essencial na transdução de sinais e pode ser útil para prever tanto a força quanto o tipo de sinal produzido. A presente técnica é usada frequentemente para prever a orientação de ligação de pequenas moléculas

candidatas a novos fármacos aos seus alvos proteicos e desta forma desempenha um papel importante no desenvolvimento racional de candidatas a fármacos novos.

O ancoramento molecular pode ser dividido em rígido, semi-flexível e flexível de acordo com a flexibilidade das estruturas químicas do composto ligante e da proteína do receptor, e envolver interações entre proteína-receptor, composto com estruturas pequenas-receptor. A escolha da metodologia de ancoramento molecular depende da finalidade do estudo que se quer desenvolver e é importante para que os modelos obtidos sejam o mais próximo possível do observado em modelos experimentais (ERICKSON et al., 2004).

Essa metodologia foi utilizada em alguns trabalhos descritos na literatura para se buscar novos agentes com atividade anti-BVDV (do inglês Bovine Viral Diarrhea Virus) potencial (TONELLI et al., 2010; WANG et al., 2016). No estudo de Brai *et al.* (2016) a enzima helicase DDX3 de *Drosophila vasa* (PDB: 2DB3) foi utilizada como protótipo para o estudo de agentes com ação inibidores da DDX3 candidatas a novos antivirais e pode facilmente ser utilizada para estudos de ancoramento molecular. Em virtude do potencial de desenvolvimento de novos fármacos a partir das moléculas derivadas dos compostos toluiluréis e do cetorolaco, ressalta-se a necessidade de realização de estudos complementares aos de avaliação biológica e estruturais já realizados, que possam fornecer informações novas sobre estes compostos e que permitam direcionar a obtenção de agentes bioativos novos. Em nosso estudo, será avaliado a interação dos compostos tidiazuron e cetoprofeno com o receptor do mRNA da DDX3, ainda não realizada por nenhum grupo de pesquisa.

3.4 Tidiazuron

O herbicida fenilureia, Tidiazuron (TDZ, N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ilureia) peso molecular 220.25, fórmula molecular $C_9H_8N_4OS$, é um regulador sintético do crescimento de frutos em árvores frutíferas temperadas, apresenta a capacidade de aumentar a divisão celular e expansão celular (ZHANG et al., 2017). O uso de compostos de fenilureia substituídas, desempenham efeito semelhante à citocinina, um hormônio vegetal que promove forte atividade de crescimento em tecidos vegetais. A aplicação do TDZ melhora o tamanho e o peso de frutos de maçã, kiwis, uva, caqui e pepino (VIDAL et al., 2003). O TDZ é um potente regulador de processos morfogênicos, é resistente à citocinoxidase endógena, uma enzima que catalisa a degradação das citocininas, essa supressão pode resultar no acúmulo de citocininas purinas nos tecidos vegetais (HARE; VAN STADEN, 1994; HORGAN; BURCH; PALNI,

1988). No entanto, a exposição prolongada à TDZ, o seu uso inadequado pode gerar efeitos prejudiciais que incluem anormalidade morfológica, perda da capacidade morfogênica, variações citogenéticas, alteração no enraizamento ou perda de habilidade de enraizamento, que impedem a propagação *in vitro* de espécies de plantas (DEWIR et al., 2018). Embora o TDZ demonstre papel como morforregulador na biossíntese e acúmulo de hormônios endógenos, relatado em muitas espécies de plantas (GUO et al., 2011), sua atividade antiviral ainda não foi avaliada, não há relatos na literatura que indiquem sobre essa potencialidade.

3.5 Cetoprofeno

O cetoprofeno, ácido 2- (3-benzoilfenil) pertencente ao grupo do ácido propiônico, é um fármaco anti-inflamatório não esteroideal (AINE) indicado para o tratamento de processos reumáticos, lesões ortopédicas e algias diversas, a meia-vida de eliminação plasmática é curta, de 1 - 2 h (GABOR et al., 1999; GUL et al., 2018). Os AINEs realizam sua ação inibindo ambas ciclooxigenase (COX) as isoenzimas (COX-1 e COX-2), envolvidas na síntese de prostaglandinas (PGs) do ácido araquidônico (AA). Níveis elevados de PGs sensibilizam os nociceptores periféricos e exacerbam o estímulo doloroso (MALFAIT; SCHNITZER, 2013; VOILLEY et al., 2001). No entanto, o mecanismo de ação do cetoprofeno não está completamente elucidado.

Assim como para os demais AINEs, a administração oral de cetoprofeno induz uma toxicidade gastrointestinal, como consequência da inibição da COX-1, isoforma constitutiva associada a proteção da mucosa gastrointestinal e homeostase vascular (HAWKEY, 2001). A administração crônica dos AINEs na redução da dor, mas o tratamento a longo prazo, é acompanhada por efeitos colaterais graves, pois esses agentes têm sido associados a lesões gastroduodenais e complicações hemorrágicas (VANLEERDAM et al., 2003). Não há relatos na literatura que indiquem sobre a potencialidade do cetoprofeno em interagir com o sítio ativo da DDX3, dessa maneira esse composto será avaliado neste trabalho como estratégia de intervenção farmacológica anti-DDX3.

3.4 Modelagem por homologia

A modelagem por homologia também conhecida como modelagem comparativa, é um método computacional muito comum para representar as estruturas de proteínas tridimensionais

(3D), quando há limitação na utilização de métodos experimentais, tais como a cristalografia de raios X, a ressonância magnética nuclear (RMN) ou a microscopia de força atômica, sendo que estão disponíveis apenas para uma pequena fração dentre as proteínas conhecidas. Dado que, o número de sequências protéicas contidas na base de dados do UniProt Knowledge Base – UniProtKB é maior que número de estruturas protéicas experimentalmente determinadas, depositadas no Protein Data Bank (PDB) (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; SAKHTEMAN; ZARE, 2016; SHEN; BAX, 2015). Em abril de 2017, o número de proteínas estruturalmente caracterizadas no PDB aumentou para aproximadamente 120.000, o que conta, no entanto, apenas <0,2% das seqüências de proteínas no UniProt. Assim, a obtenção de sequências de proteínas se torna mais fácil do que elucidar suas estruturas (DENG; JIA; ZHANG, 2018). Esse impedimento de obtenção de estruturas de alta resolução, é frequentemente o problema de pesquisas que buscam, por exemplo, entender a função biológica de uma proteína e propriedades de interação em detalhes moleculares ou para o desenho de fármacos com base na estrutura (DENG; JIA; ZHANG, 2018; ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; SAKHTEMAN; ZARE, 2016).

O método de modelagem por homologia é uma ferramenta adequada para predição teórica de estruturas protéicas, dado que uma grande vantagem em relação a técnicas experimentais é o curto espaço de tempo e a custos reduzidos para prever a estrutura tridimensional a partir de sua estrutura primária. Uma aplicação de modelagem comparativa é a obtenção da estrutura tridimensional da proteína-alvo, considerado um passo vital em estudos computacionais baseados em estrutura, como simulações de acoplamento e dinâmica molecular (KHODDAMI et al., 2015) . Diferentes softwares já foram desenvolvidos para prever as estruturas 3D de proteínas. Os programas SWISSMODEL, PSI-BLAST, MODLOOP e MODELLER são alguns exemplos de aplicações projetadas para estudos comparativos de modelagem (BIASINI et al., 2014).

A abordagem computacional mais bem sucedida de construção de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, sendo o único método capaz de gerar com segurança um modelo 3D de uma proteína. Este método leva em consideração uma observação básica, de que seqüências semelhantes da mesma família evolutiva frequentemente adotam estruturas protéicas semelhantes. Portanto, a modelagem comparativa identifica proteínas relacionadas à evolução (sequência de aminoácidos) com estruturas determinadas por técnicas experimentais que podem ser usadas como modelos para prever a proteína alvo de interesse, a base da modelagem comparativa requer as seguintes etapas essenciais: a) homologia

entre seqüências de aminoácidos resulta em semelhança entre formas e estruturas espaciais e funções biológicas nas células; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: α -hélice e β -folha); (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias; (d) avaliar a qualidade do modelo resultante. Este procedimento pode ser repetido até que um modelo satisfatório seja obtido (ANDRADE; FILHO; BICCA DE ALENCASTRO, 2003; DENG; JIA; ZHANG, 2018).

O programa MODELLER é amplamente utilizado para modelagem comparativa de estruturas tridimensionais de proteínas (ESWAR et al., 2003; FISER; SALI, 2003; WATERHOUSE et al., 2018; WEBB; SALI, 2016). MODELLER é usado com mais frequência para homologia ou modelagem de estrutura de proteína comparativa: O usuário fornece um alinhamento de uma seqüência a ser modelada com estruturas relacionadas conhecidas e o MODELLER calculará automaticamente um modelo com todos os átomos de não hidrogênio. De um modo mais geral, as entradas para o programa são restrições na estrutura espacial da (s) seqüência (s) de aminoácidos e ligandos a modelar. A saída é uma estrutura 3D que satisfaz tanto quanto possível essas restrições (SALI et al., 1995).

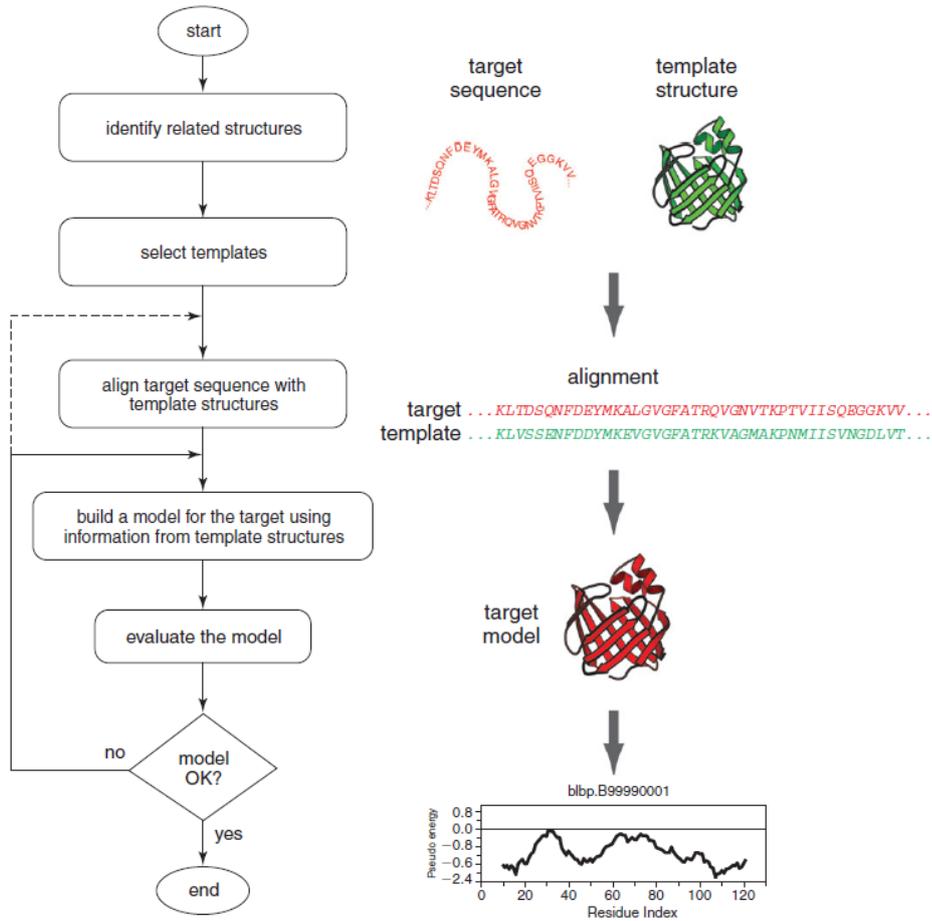


Figura 1: Modelagem comparativa de proteínas pela satisfação de restrições espaciais. Primeiro, as estruturas 3D conhecidas do modelo são alinhadas com a sequência alvo a ser modelada. Na segunda etapa, características espaciais, tais como distâncias C - C, ligações de hidrogênio e ângulos diédricos de cadeia lateral e cadeia lateral, são transferidos dos modelos para o alvo. Assim, várias restrições espaciais em sua estrutura são obtidas. Terceiro, o modelo 3D é obtido satisfazendo todas as restrições o melhor possível. Adaptado de Sali, 1995.

Desta forma, sua capacidade de fazer mutações pontuais em estruturas PDB torna-o adequado para muitos estudos de modelagem molecular no campo de projetos baseado em estruturas de inibidores específicos.

4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES

A metodologia, resultados e discussões da dissertação estão apresentados na forma de manuscrito científico, o qual será submetido para o período “*BIOINFORMATION, Discovery at the interface of physical and biological sciences*”.

5 MANUSCRITO

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE NOVOS DERIVADOS DE INIBIDORES DA HELICASE HUMANA DDX3

RESUMO

A abordagem terapêutica mais utilizada no combate a doenças virais tem como alvo atingir diretamente enzimas ou componentes estruturais de um determinado vírus. No entanto, cofatores celulares envolvidos na reprodução de vírus representam uma abordagem terapêutica promissora na pesquisa de substâncias com atividade antiviral. O polipeptídeo Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD-box) 3 (DDX3X) ligada ao cromossomo X, pertence a uma grande família de helicases de RNA dependentes de ATP conhecidas como a família de proteínas DEAD-box. A DDX3X é detectada em diversos tecidos e está envolvida em processos biológicos primordiais como a progressão do ciclo celular, resposta imune inata e apoptose, indicando o papel universal da DDX3 na homeostase celular. É destacada sua presença em disfunções que resultam no desenvolvimento de tumores e no ciclo de replicação viral contra ameaças humanas, como HIV, HVC. Uma vez que a estrutura tridimensional de DDX3 humana em sua conformação fechada não está disponível experimentalmente, a mesma foi predita por modelagem de homologia a partir da ferramenta MODELLER 9v20, seguido de refinamento de modelo, utilizando múltiplos modelos do PDB 5e7i e 2db3. O modelo protéico foi utilizado para ancoragem dos compostos tidiazuron e cetoprofeno inibidores potenciais da DDX3 utilizando o software Autodock 4.2. A simulação de acoplamento com a menor energia de ligação, -7.19 kcal/mol apresentou um número de resíduos em contato próximo com o cetoprofeno ancorado, tais como: PRO 274, GLY 302, GLY 325, ARG 326, THR 323, PHE 357, GLN 477, ARG 480, GLY 504, ASP 506. Por outro lado, o tidiazuron apresentou energia de ligação de -5.62 kcal/mol. Curiosamente, entre os resíduos de ligação de ambos os compostos estão a PHE 357 e o THR 323. Estes resíduos desempenham papel fundamental na atividade dos inibidores da DEAD-BOX DDX3, candidatos a inibirem a entrada de vírus na célula. Assim, este estudo fornece mais informações sobre as relações inibitórias da helicase DDX3 e abre caminhos para a concepção de estratégias eficazes para superar a resistência aos antivirais ao inibir a replicação de vírus que utilizam cofatores celulares.

Palavras-chave: Modelagem de homologia, DEAD BOX DDX3, predição de bioatividade, predição de propriedades físico-químicas, ancoramento molecular, antivirais.

ABSTRACT

The therapeutic approach most used in the fight against viral diseases is aimed at directly targeting enzymes or structural components of a particular virus. However, cellular cofactors involved in virus reproduction represent a promising therapeutic approach in the search for substances with antiviral activity. The X-linked Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD-box) 3 (DDX3X) polypeptide belongs to a large family of ATP-dependent RNA helicases known as the DEAD-box protein family. DDX3X is detected in many tissues and is involved in primordial biological processes such as cell cycle progression, innate immune response and apoptosis, indicating the universal role of DDX3 in cellular homeostasis. Its presence is highlighted in dysfunctions that result in the development of tumors and in the viral replication cycle against human threats such as HIV, HVC. Since the three-dimensional structure of human DDX3 in its closed conformation is not available experimentally, it was predicted by homology modeling using the MODELLER 9v20 tool, followed by model refinement, using multiple PDB 5e7i and 2db3 models. The protein model was used to anchor the compounds tidiazuron and ketoprofen potential inhibitors of DDX3 using Autodock 4.2 software. The coupling simulation with the lowest binding energy, -7.19 kcal/mol, showed a number of residues in close contact with the anchored ketoprofen, such as: PRO 274, GLY 302, GLY 325, ARG 326, THR 323, PHE 357, GLN 477, ARG 480, GLY 504, ASP 506. On the other hand, thidiazuron showed binding energy of -5.62 kcal/mol. Interestingly, among the binding residues of both compounds are PHE 357 and THR 323. These residues play a fundamental role in the activity of DEAD-BOX DDX3 inhibitors, candidates to inhibit the entry of viruses into the cell. Thus, this study provides more information about the DDX3 helicase inhibitory relationships and opens the way for the design of effective strategies to overcome antiviral resistance by inhibiting the replication of viruses that use cellular cofactors.

Keywords: Homology modeling, DEAD BOX DDX3, prediction of bioactivity, prediction of physicochemical properties, molecular anchoring, antivirals.

1 INTRODUÇÃO

Vírus são organismos biológicos acelulares de estrutura simples que necessitam de uma célula hospedeira para se multiplicarem. Seus genomas são constituídos por fita simples ou dupla de RNA (ácido ribonucléico) ou DNA (ácido desoxirribonucléico), além de capsídeo proteico que pode ser revestido por envelope ou capa lipídica. Esses agentes patogênicos podem ser classificados de acordo com o tipo de ácido nucléico que possuem, das características do sistema que os envolvem, ou ainda do tipo de células que infectam. Esses agentes codificam proteínas virais capazes de interagir com as proteínas hospedeiras, explorando funções celulares a seu favor (BRAI et al., 2016; GARBELLI et al., 2011). A incidência de enfermidades causadas por vírus atinge a humanidade e animais no mundo inteiro (BEKERMANN; EINAV, 2015; LOU; SUN; RAO, 2014). Sendo assim, estudos que visam o controle de propagação e manifestação de tais doenças, além da inativação destes patógenos, são de grande interesse em saúde pública por representarem ameaça importante.

A maioria das abordagens terapêuticas atuais usadas para o tratamento de infecções virais e das doenças causadas por estes envolve o uso de substâncias que atuam diretamente em alvos do vírus ou das organelas, proteínas ou ácidos nucléicos da célula hospedeira. Embora terapeuticamente bem sucedidos, muitos podem perder a eficiência devido ao surgimento de resistência aos medicamentos, ou apresentam efeitos tóxicos (BEKERMANN; EINAV, 2015; LOU; SUN; RAO, 2014).

Estudos recentes têm relatado diversos fatores do hospedeiro, como enzimas, receptores, organelas, que são importantes para a replicação de alguns vírus. Nesta perspectiva, cofatores celulares envolvidos na reprodução de vírus representam uma abordagem terapêutica promissora na pesquisa de substâncias com atividade antiviral (ARHEL; KIRCHHOFF, 2010; FAZI et al., 2015). A enzima DDX3 pertence a uma grande família de helicases de RNA dependentes de ATP conhecidas como a família de proteínas DEAD-box, possui dois homólogos, DDX3X e DDX3Y, localizados nos cromossomos X e Y, respectivamente. A DDX3X é detectada em diversos tecidos e está envolvida em processos biológicos chave como a progressão do ciclo celular, resposta imune inata e apoptose, inclusive em diferentes etapas do ciclo de replicação de diferentes vírus que exploram a capacidade da DDX3 em montar grandes complexos de ribonucleoproteínas (VALIENTE-ECHEVERRÍA; HERMOSO; SOTO-RIFO, 2015). Esta enzima tem função primordial na regulação de diversos genes e no metabolismo de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) em organismos como o humano,

bovino, caprino e de insetos como a *Drosophila melanogaster* (ARIUMI, 2014). No caso de vírus, tem importância destacada no ciclo de replicação agentes virais com relevante impacto na saúde humana, como os pertencentes a diferentes famílias: CMV (Herpesviridae), HIV-1 (Retroviridae), HCV, Vírus da Encefalite Japonesa, Vírus da Dengue (DENV), Vírus do Nilo Ocidental (WNV; Flaviviridae), Vírus Vacínia (Poxviridae) e Norovirus (Caliciviridae) (BRAI et al., 2016; SAMAL et al., 2015; VALIENTE-ECHEVERRÍA; HERMOSO; SOTO-RIFO, 2015). Através de múltiplos mecanismos a DDX3 promove a replicação desses vírus de RNA, como ocorre no ciclo do HIV, a função da helicase é exportação nuclear e tradução de mRNA sem *splicing* viral (VALIENTE-ECHEVERRÍA; HERMOSO; SOTO-RIFO, 2015). Neste contexto, uma vez que as proteínas celulares são menos propensas a sofrer mutações do que as virais, esse mecanismo de ação pode ser explorado para direcionar candidatos a fármacos antivirais a alvos protéicos do hospedeiro. Este cenário pode tornar mais difícil a ocorrência de resistência aos medicamentos (TINTORI et al., 2014). Diante do exposto, a DDX3 tem sido descrita como um importante alvo para a prospecção de novos antivirais (BRAI et al., 2016; NOBLE et al., 2012; SAMAL et al., 2015; VALIENTE-ECHEVERRÍA; HERMOSO; SOTO-RIFO, 2015). Em consonância com esse potencial uso da DDX3, um estudo realizado por Radi *et al.* (2012) obteve alguns resultados ao inibir a ligação do RNA no sítio ativo da DDX3, o que resultou em inibição do crescimento celular, prejudicando assim a replicação do HIV-1, aliados à baixa toxicidade em testes pré-clínicos. Sendo assim, a inibição de RNA helicases individuais como rota terapêutica, está sendo explorada atualmente.

Numerosas sequências da helicase DDX3 humana foram depositadas em bancos de dados de sequência de proteínas. As proteínas DEAD-box contêm dois domínios conservados que contribuem para a ligação de RNA e ATP, a ativação do sítio de ligação do RNA envolve a transição de estados conformacionais em aberta, pré-ligação de RNA e conformação fechada. A ligação de RNA completa ocorre com o fechamento da fenda, ou seja, na conformação fechada da helicase DDX3 (SCHÜTZ et al., 2010). Contudo, até o momento, uma estrutura tridimensional da conformação fechada determinada experimentalmente não está disponível, inviabilizando estudos de potenciais inibidores da ligação do RNA. Desta forma, a estrutura 3D da DDX3 humana ligada ao RNA (conformação fechada) foi obtida por modelagem de homologia neste trabalho. A proteína DDX3 é um alvo terapêutico interessante para o estudo de possíveis candidatos a fármacos que possam atuar como agentes antivirais ao considerar a interação vírus-DDX3.

Com base no proposto neste trabalho, a inibição de DDX3 por uma molécula pequena pode ser explorada para o desenvolvimento de um agente antiviral de amplo espectro para uso humano e também aplicação em doenças que acometem animais. Nesta pesquisa, empregamos modelos experimentais *in silico* para sugerir que os compostos tidiazuron e cetoprofeno, selecionados com base na semelhança estrutural com inibidores sintéticos da DDX3 existentes (BRAI et al., 2016; SAMAL et al., 2015), formam interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da DDX3, podendo ser direcionados como candidatos potenciais com atividade inibitória dessa helicase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Softwares

O modelo por homologia foi gerado utilizando o software MODELLER 9v20. Os modelos previstos foram avaliados por servidores disponíveis gratuitamente on-line, como PROCHECK, ERRAT e VERIFY-3D. A análise de ancoramento molecular foi realizado entre o melhor modelo de DDX3, denominado como DDX3h (homóloga), e os compostos tidiazuron e cetoprofeno usando AutoDock 4.2. Por meio do software LigPlot, foi obtido um diagrama bidimensional dessas interações. A visualização interativa e a análise de estruturas moleculares foram realizadas usando Chimera.

2.2 Compostos

No presente trabalho, selecionamos 2 ligantes (tidiazuron e cetoprofeno) para os estudos de ancoramento molecular, baseados na semelhança estrutural com inibidores da DDX3 já estabelecidos.

2.3 Modelagem por homologia

A sequência completa de aminoácidos da DDX3 humana foi obtida a partir da base de dados de sequências de proteínas do UniProt Knowledge Base – UniProtKB (ID número de acesso: O00571) e usado como alvo para modelagem de homologia. A modelagem de homologia foi realizada utilizando o MODELLER. O programa MODELLER é utilizado para

homologia ou modelagem comparativa de estruturas tridimensionais de proteínas (WEBB; SALI, 2016). A modelagem consistiu em comparar a sequência de destino submetida com as estruturas disponíveis no banco de dados do Protein Data Bank (PDB), e a pesquisa foi realizada por meio do programa BLAST. As estruturas tridimensionais selecionadas como modelos foram a RNA helicase da *Drosophila vasa* DEAD-box (código PDB: 2DB3) com resolução de 2,20 Å, que foi cristalizada em sua conformação fechada ligada ao RNA. A estrutura 2DB3 demonstrou uma similaridade de sequência de aminoácidos de 49% com o DDX3 humano. A estrutura cristalina da conformação aberta de DDX3 humana (código PDB: 5E7I) foi usada como segundo modelo para preencher os resíduos pertencentes ao motivo único de DDX3, que estão faltando na estrutura do 2DB3 (FAZI et al., 2015). O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado utilizando o servidor online Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011), é mostrado na Figura 3. A estrutura gerada em formato PDB, a partir do MODELLER, foi usada como alvo para os estudos de ancoramento molecular.

Foram construídos 5 modelos 3D pela satisfação de restrições espaciais usando parâmetros automáticos do MODELLER. O melhor modelo entre as 5 estruturas foi classificado com base na pontuação calculada a partir da função de pontuação de energia proteica discreta otimizada (DOPE). Com base no escore do DOPE, o melhor modelo foi escolhido para o refinamento do *loop*. Os resíduos de *loop* variando de 1 a 97 foram utilizados para o refinamento. A estrutura com o menor escore do DOPE foi avaliada e melhorada após o refinamento, que resultou em 10 conformações. Novamente, o parâmetro DOPE foi utilizado para classificar a melhor estrutura gerada. Em seguida, o modelo teve sua energia minimizada por CHIMERA 1.13.1, e por fim usado para análises posteriores.

2.4 Análise de estrutura secundária, refinamento e validação de modelo

Análise da estrutura secundária (alfa hélice, folhas beta, voltas e bobinas) da sequência da helicase DDX3 foi prevista pelo programa Self-Optimized Prediction Method – SOPMA, que determina a estabilidade e função da proteína (GEOURJON; DELEAGE, 1995). A qualidade estereoquímica dos modelos gerados foi verificada com o programa PROCHECK, através da análise do gráfico de Ramachandran (ROMAN LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 1983). Além disso, a qualidade do modelo foi avaliada pelo servidor VERIFY-3D, que verifica a compatibilidade do modelo com sua própria sequência de aminoácidos, identificando a associação entre a estrutura 3D e a sequência (EISENBERG; LOTHY; BOWIE,

1997). A ferramenta de verificação de proteínas ERRAT, também foi utilizada para validação estrutural do modelo (COLOVOS; YEATES, 1993). O melhor modelo 3D foi selecionado utilizando-se essas ferramentas de avaliação e validação. A estrutura foi refinada sendo submetida à minimização de energia usando CHIMERA (PETTERSEN et al., 2004).

2.5 Ancoramento Molecular

A estrutura química otimizada dos compostos candidatos a inibidores da DDX3 foram salvas em extensão *.pdb* anterior a seu uso nos estudos de ancoramento molecular (*Docking molecular*). A ancoragem molecular entre o modelo de homologia da DDX3 e os compostos foi realizada utilizando AutoDock 4.2.6 (MORRIS et al., 2009) e os compostos (ligantes) foram considerados flexíveis, enquanto a macromolécula (receptor) um corpo rígido. Os átomos de hidrogênio polares com carga Gasteiger foram adicionados à enzima e as estruturas dos compostos. Este software permitiu ainda a investigação e predição dos potenciais modos de ligação e as constantes de inibição (K_i) no modelo gerado.

O local de ligação do RNA da enzima em conformação fechada foi definido como o sítio ativo e considerado como uma cavidade (ou bolsa), que foi inserida numa caixa de grade (*GRID*) centrada nos resíduos PHE 357 e THR 323. Os tamanhos adotados da caixa foram de 88x64x86 pontos para os eixos x, y, z, respectivamente, com um espaçamento de grade de 0,375 Angstroms (FAZI et al., 2015). As simulações de acoplamento foram realizadas para 10 corridas usando o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), que encontra a melhor conformação do ligante no sítio ativo do receptor. Enquanto, outros parâmetros foram definidos para valores padrão.

As estruturas das conformações moleculares das 10 principais pontuações de encaixe de cada ligante no sítio ativo da proteína foram mantidas para inspeção visual e análise. O complexo ancorado com menor energia de ligação foi selecionado para análise posterior, visto que é considerada a conformação mais estável e confiável. Neste contexto, esta pose do ligante com melhor encaixe acoplado no sítio ativo foi selecionada. Para melhor entendimento dos ancoramentos moleculares, utilizou-se a interface LigPlot no programa Maestro (SCHRODINGER, 2018) para a geração de diagramas bidimensionais da interação entre DDX3 e os compostos ancorados (ROMAN LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 1983). As imagens dos complexos de enzimas-ligantes geradas juntamente com manipulações gráficas

foram feitas usando os softwares gráficos moleculares PyMOL e Chimera, e encontram-se ilustradas nas figuras 9 e 10.

2.6 Predição de propriedades físico-químicas e toxicológicas

As propriedades físico-químicas moleculares e toxicológicas do composto bioativo foram previstas aplicando-se programas computacionais Molinspiration Chemoinformatics e Osiris Property Explorer disponíveis online. No estudo de propriedades que podem ter influência sobre a atividade biológica foram avaliados os descritores moleculares contidos na regra dos cinco de Lipinski, que são: coeficiente de partição octanol/água calculado (cLogP), coeficiente de solubilidade (cLogS), peso molecular (PM), número de doadores (soma dos átomos de *O-H* e *N-H*) e aceptores (soma dos átomos de *O* e *N*) de ligação de hidrogênio e o número de violações da Regra dos cinco. Também se calculou a área de superfície polar molecular (TPSA), número de rotações (nrotb) que podem ser importantes para a atividade biológica. A avaliação da toxicidade do composto foi prevista em com base em riscos de efeitos indesejados, como: mutagênico, tumorigênico, efeito sobre a reprodução e irritante (LIPINSKI et al., 2001).

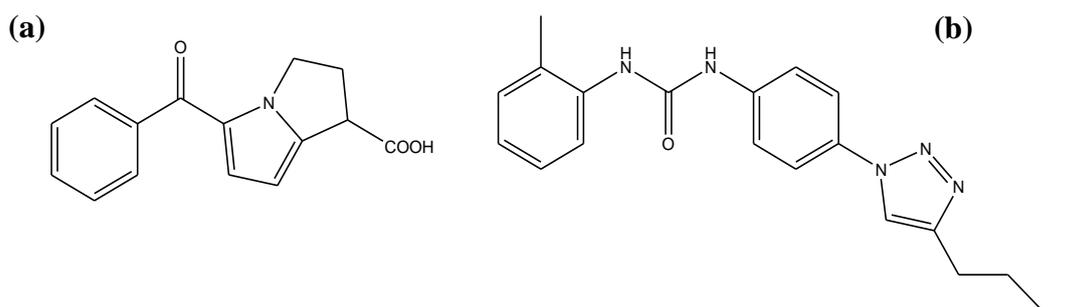
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos

A proteína DDX3 é um alvo interessante para o estudo de possíveis candidatos a fármacos que possam atuar como agentes anti-DDX3. Não há estudos descritos na literatura que relacionem as substâncias tidiazuron e cetoprofeno com ação de inibição da proteína do hospedeiro DDX3 envolvida na replicação de vírus. Algumas substâncias como os derivados das toluiluréias (BRAI et al., 2016), e o fármaco cetorolaco tem atividade de inibição da enzima DDX3 humana estabelecida (SAMAL et al., 2015), sendo que o composto 2 tem proposição de atividade antiviral frente a quatro diferentes vírus, HCV, Dengue, da Febre do Oeste do Nilo e HIV. O mecanismo de ação composto 2 (das toluiluréias) foi avaliado através do teste inibição enzimática frente as enzimas DDX1, NS3 (de Dengue e HCV) e DDX3, para avaliar a seletividade do composto, sendo esta última a proteína envolvida. Estas substâncias e análogos estruturais, como os compostos selecionados para este estudo (tidiazuron e cetoprofeno), se

apresentam como protótipos para o estudo de inibidores de enzima DDX3 com a finalidade de se avaliar o efeito de inibição de replicação viral e para desenvolver fármacos antivirais novos. Neste contexto, observa-se que o cetoprofeno e o herbicida tidiazuron, que são análogos estruturais do ceterolaco e do derivado toluiluréia, se apresentam como candidatos para o estudo de interação com os modelos de enzima DDX3 a serem obtidos neste trabalho.

Figura 1. Estrutura química do ceterolaco (a) e do composto 2 inibidores da DDX3 humana (b).



O programa computacional *Spartan for Windows, versão 08* (Wavefunction, Inc. USA), foi utilizado para desenho, otimização de geometria molecular da estrutura com o método teoria do funcional de densidade com o emprego de base de dados teóricos 6-31G* antes destas estruturas serem submetidas aos estudos de ancoramento molecular em modelos DDX3 3D.

3.2 Homologia Molecular

3.2.1 Seleção de modelo e alinhamento de sequência

Para identificar as proteínas mais próximas da sequência alvo humana da DEAD-BOX DDX3, realizou-se uma análise de estruturas protéicas tridimensionais com o emprego de ferramenta de busca de alinhamento local BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível online, contra entradas de sequências protéicas disponíveis no site do Protein Data Bank (PDB). Este procedimento foi realizado para se identificar a estrutura cristalina (obtida experimentalmente) que servirá como molde nos estudos realizados.

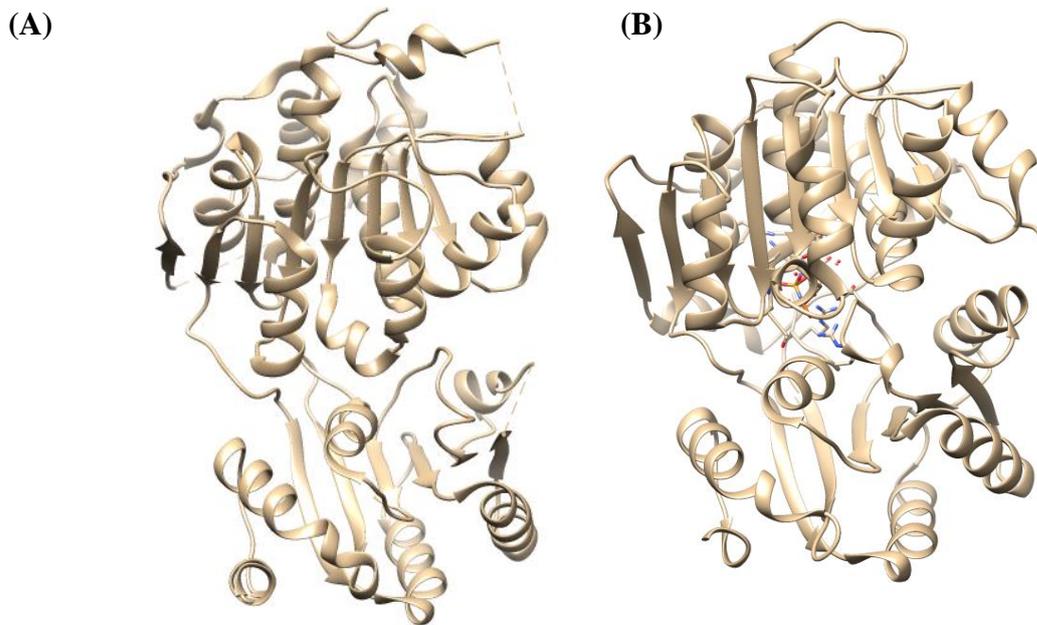
O BLAST forneceu uma lista de estruturas de proteínas de diversas origens naturais conhecidas, e que correspondem a sequência de aminoácidos alvo (O00571). O resultado obtido a partir desta pesquisa expressa as correspondências de maior pontuação com 100-49% de identidade de sequência de aminoácidos (Tabela 1).

No cenário proposto, verificou-se que a estrutura de enzima codificada 5E7I apresentou maior valor de similaridade (100%), e foi escolhida como primeiro modelo, para a continuidade dos estudos, por corresponder a conformação de pré-ligação ao RNA (FLOOR et al., 2016). Também foi usada como segundo modelo, a sequência 2DB3_A de *Drosophila vasa*, que embora tenha mostrado identidade de sequência de 49%, a mesma representa a estrutura fechada da DDX3, indisponível na forma humana. A pesquisa de similaridade de sequência também destacou a proteína eIF4AIII (PDB:2JOS), que foi cristalizada em uma conformação fechada, entretanto, apresenta uma homologia de 37%. A próxima etapa envolveu a modelagem baseada na abordagem de seleção de múltiplos modelos de uma estrutura tridimensional híbrida da DDX3 fechada. A estrutura em 3D dos modelos 5E7I e 2DB3 são ilustradas na Figura 2.

Tabela 1. Resultados da pesquisa de sequências de proteínas com o uso do BLAST.

Alvo	Modelo/Cadeia PDB ID		Identidade (%)	Query cover	E-value	Nome
O00571	5e7i	B	100%	68	0.0	Crystal Structure Of The Active Catalytic Core Of The Human Dead-box Protein Ddx3
	2i4i	A	100%	62	0.0	Crystal Structure Of Human Dead-Box Rna Helicase Ddx3x
	4PX9	A	100%	41	0.0	DEAD-box RNA helicase DDX3X Domain 1 with N-terminal ATP-binding Loop Ddx3 Helicase Domain
	2JGN	A	100%	25	2E-120	
	3JRV	C	100%	3	6E-04	Structure of poxvirus K7 protein in complex with RNA helicase DDX3
	4PXA	A	99%	67	0.0	Dead-box Rna Helicase Ddx3x Cancer-associated Mutant D354v
	6CZ5	A	99%	72	0.0	Crystal structure of small molecule AMP-acrylamide covalently bound to DDX3 S228C
	1WRB	A	58%	39	3E-102	Crystal Structure Of The N-Terminal Reca-Like Domain Of Djvlgb, A Prasnarian Vasa-Like Rna Helicase
	5NT7	B	52%	23	2E-45	Structure Of The Lotus Domain Of Oskar In Complex With The C-terminal Reca-like Domain Of Vasa
	2DB3	A	49%	65	3E-137	Structural Basis For Rna Unwinding By The Dead-Box Protein <i>Drosophila Vasa</i>

Figura 2. Estrutura 3D das conformações adotadas por DDX3. (A) Pré-conformação de ligação ao RNA (PDB: 5E7I), (B) conformação fechada (PDB: 2DB3).



3.2.2 Geração de Modelo 3D e Alinhamento de estruturas

A estrutura 3D da DEAD-BOX DDX3 (h) foi construída por modelagem de homologia baseada nos modelos pré-estabelecidos, que foram obtidos a partir do banco de dados de proteínas (figura 2). Nesta etapa foram escolhidos 2 modelos os quais foram submetidos a alinhamento para verificação de similaridade estrutural.

A sequência alvo da helicase DDX3, descrita em código de número de acesso: Uniprot-O00571, foi alinhada com a estrutura cristalográfica da helicase DDX3 humana que foi cristalizada em sua conformação pré-fechada de ligação ao RNA (PDB: 5E7I), usada como primeiro modelo e com a *Drosophila vasa* (PDB: 2DB3) selecionada como segundo modelo (Figura 2). O alinhamento de múltiplas sequências foi criado usando a ferramenta computacional Clustal Omega, disponível na web. Os resultados gerados a partir dos alinhamentos estão ilustrados na Figura 3 e evidenciaram as regiões de identidade de sequência entre os modelos e a sequência alvo.

Figura 3. Alinhamento de múltiplas seqüências geradas para o modelo 3D usando o software Clustal Omega.

sp O00571 DDX3X_HUMAN	MSHVAVENALGLDQQFAGLDLNSDDNQSGGSTASKGRYIPPHLRNREATKGFYDKDSSGW	60
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	-----	0
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	-----	0
sp O00571 DDX3X_HUMAN	SSSKDKDAYSSFGSRSDSRGKSSFFSDRGSGRGRFDDRGRSDYDYGISRGDRSGFGKFE	120
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	-----	0
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	-----	0
sp O00571 DDX3X_HUMAN	RGGNSRWCDKSDDEDDWSKPLPPSERLEQELFSGGNTGINFEKYDDIPVEATGNCCPPHIE	180
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	-----EDDWSKPLPPSERLEQELFSGGNTGINFEKYDDIPVEATGNCCPPHIE	48
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	---GPLGSPEFPGEFYIPPEPSNDAIEIFSSGSIAGIHFSSKYNNIPVKVTGSDVPQPIQ	56
	:: * ** : : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp O00571 DDX3X_HUMAN	SFSDVEMGEIIMGNIELTRYRTPVQKHAIPKIKRDLMACAQTGSGKTA AFLPILS	240
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	SFSDVEMGEIIMGNIELTRYRTPVQKHAIPKIKRDLMACAQTGSGKTA AFLPILS	108
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	HFTSADLRDIIDNVNKSQYKIPTIQKCSIPVSSGRDLMACAQTGSGKTA AFLPILS	116
	* .. : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp O00571 DDX3X_HUMAN	QIYSDGPGEALRAMKENGRYGRKQYPISLVLAPTRELAVQIYEEARKFSYRSRVRPCV	300
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	QIYSDGPGEALRAMKENGRYGRKQYPISLVLAPTRELAVQIYEEARKFSYRSRVRPCV	168
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	KLLEDPHELE-----LGRPQVVIVSPTR ELAIQIFNEARKFAFESYLKIGIV	163
	:: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp O00571 DDX3X_HUMAN	YGGADIGQQIRD LER GCHLLVATPGRLVDMMERGKIGLDFCKYLVLDEADRMLDMGFEPQ	360
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	YGGADIGQQIRD LER GCHLLVATPGRLVDMMERGKIGLDFCKYLVLDEADRMLDMGFEPQ	228
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	YGGTSFRHQNECITRGCHVVIATPGRLDFVDRTFITFEDTRFVVLDEADRMLDMGFSED	223
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp O00571 DDX3X_HUMAN	IRRIVEQDTMPPKGV RHTMMFSATFPKEIQMLARDFLDEYIFLAVGRVGTSENITQKV	420
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	IRRIVEQDTMPPKGV RHTMMFSATFPKEIQMLARDFLDEYIFLAVGRVGTSENITQKV	288
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	MRRIMTHVTMRPE--HQTLMFSA TPEEIQR MAGEFLKNYVFAIGVGGACSDVKQTIY	281
	:: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp O00571 DDX3X_HUMAN	WVEESDKRSFLDLLNATGKDSLTLV FVETKKGADSLDFLYHEGYACTSIHGDRSQDR	480
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	WVEESDKRSFLDLLNATGKDSLTLV FVETKKGADSLDFLYHEGYACTSIHGDRSQDR	348
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	EVNKYAKRSKLIILSEQA--DGTIVFVETKRGADFLASFLSEKEFPTTSIHGDR LQSQR	339
	* .. * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp O00571 DDX3X_HUMAN	EEALHQFRSGKSPILVATAVAARGLDISNVKHVINFDPDIEEYVHRIGRTGRVGNLGL	540
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	EEALHQFRSGKSPILVATAVAARGLDISNVKHVINFDPDIEEYVHRIGRTGRVGNLGL	408
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	EQALRDFKNGSMKVL IATSVASRGLDIKNIKHVINYDMP SKIDDYVHRIGRTGRVGNNGR	399
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp O00571 DDX3X_HUMAN	ATSFNER-NINITKDLLLVEAKQEVPSWLENMAYEHYKSSRGRSKSRFSGGFGA	599
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	ATSFNER-NINITKDLLLVEAKQEVPSWLENMAYEHYKSS-----	452
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	ATSFDPKDR AIAADLVKILEGSGQTPDFLRTC-----	434
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
sp O00571 DDX3X_HUMAN	RDYRQSSGASSSFSSSRASSRSRGGGGHSSRGFGGGYGGFYNSDGYGGNYNSQGV	659
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	-----	452
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	-----	434
sp O00571 DDX3X_HUMAN	WGN	662
5E7I:B PDBID CHAIN SEQUENCE	---	452
2DB3:A PDBID CHAIN SEQUENCE	---	434

Do total de 5 modelos construídos para a DDX3, o modelo número 1 (O00571.B99990001) foi selecionado como o melhor modelo de acordo com a função de pontuação conhecida como DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*), utilizada para fins de classificação da melhor estrutura gerada. Este modelo apresentou menor energia DOPE com valor de -59026.367188, em comparação com outros modelos, (Tabela 2). Assim, o modelo 1

foi considerado para estudos posteriores após refinamento usando o comando “*loop_refine.py*”, que contribuiu para obtenção de uma estrutura com melhor resolução, minimizando os erros na geometria da proteína.

Tabela 2. Valores de pontuação DOPE dos modelos 3D da DDX3 gerados.

Número	Modelo	Valor DOPE
1	O00571.B99990001	-59026.367188
2	O00571.B99990002	-57913.332031
3	O00571.B99990003	-57951.035156
4	O00571.B99990004	-57913.332031
5	O00571.B99990005	-57913.332031

Novamente o software Modeller 9 v.20 (EISENBERG, 1997) foi utilizado nesta etapa para gerar novas conformações e recalcular as pontuações DOPE. Nesta etapa, conhecida como refinamento, foram geradas 10 novas conformações. Repetidamente, a classificação do melhor modelo foi baseada na menor pontuação de DOPE e de acordo com os valores descritos na tabela 3 o modelo mais adequado foi no. 9 (O00571.BL000900001). A pontuação do DOPE para os modelos melhorou de -59026.367188 para -60795.953125, o que auxiliou alcançar um aperfeiçoamento na qualidade física da estrutura final. O modelo final da helicase determinada por modelagem comparativa é mostrado na Figura 4.

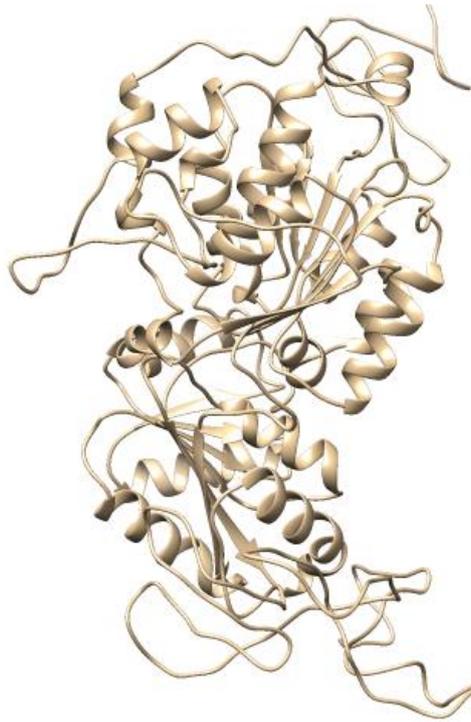


Figura 4. Modelo final obtido por modelagem de homologia, da DDX3 na conformação fechada.

Tabela 3. Valores de pontuação DOPE dos modelos 3D da DDX3 gerados com o uso de software Modeller.

Número	Modelo	Valor DOPE
1	O00571.BL00010001	-59588.734375
2	O00571.BL00020001	-60506.960938
3	O00571.BL00030001	-59808.859375
4	O00571.BL00040001	-59947.328125
5	O00571.BL00050001	-57913.332031
6	O00571.BL00060001	-60047.953125
7	O00571.BL00070001	-60676.070313
8	O00571.BL00080001	-60478.476563
9	O00571.BL00090001	-60795.953125
10	O00571.BL00100001	-60528.117188

3.2.3 Validação do modelo

Um dos principais problemas na homologia estrutural de proteínas é a identificação de erros em modelos experimentais e teóricos de estruturas de proteínas. De acordo com o desenvolvimento dos métodos de determinação de estruturas tridimensionais de proteínas, observou-se que verificar se o modelo proteico 3D final está correto se tornou um problema recorrente.

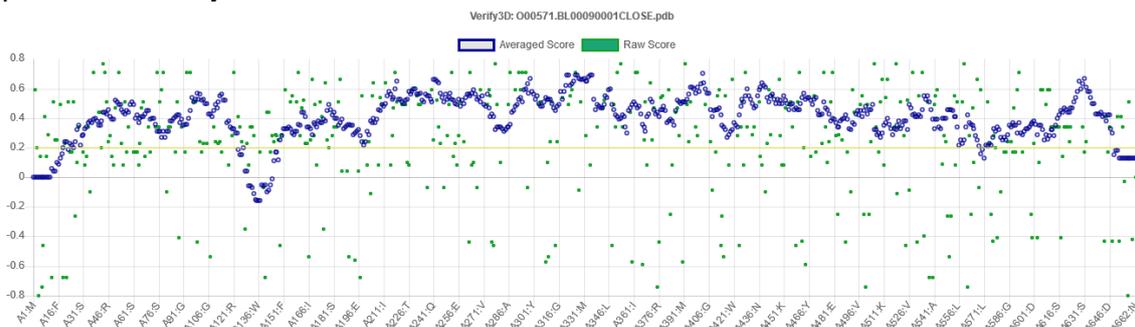
sugerindo que o modelo previsto é de boa qualidade (Tabela 4). Esses resultados apontaram que as propriedades estereoquímicas gerais do modelo construído foram altamente confiáveis e o modelo pode ser útil para subsequentes estudos de modelagem molecular.

Tabela 4. Estatísticas da Análise de Ramachandran (Gráfico) do modelo DDX3h.

Estatísticas da Análise de Ramachandran (Gráfico)	Número do Resíduo	%
Resíduos da região mais favorável [A, B, L]	468	83,6
Resíduos de regiões adicionais permitidas [a, b, l, p]	80	14,3
Resíduos de regiões generosas permitidas [a, b, l, p]	10	1,8
Resíduos de regiões não permitidas	2	0,4
Número de resíduos não-glicina e não-prolina	560	100
Número de resíduos terminais [excl. Gli and Pro]	2	-
Número de resíduos glicina [em forma de triângulos]	76	-
Número resíduos de prolina	24	-
Número Total de Resíduos	662	-

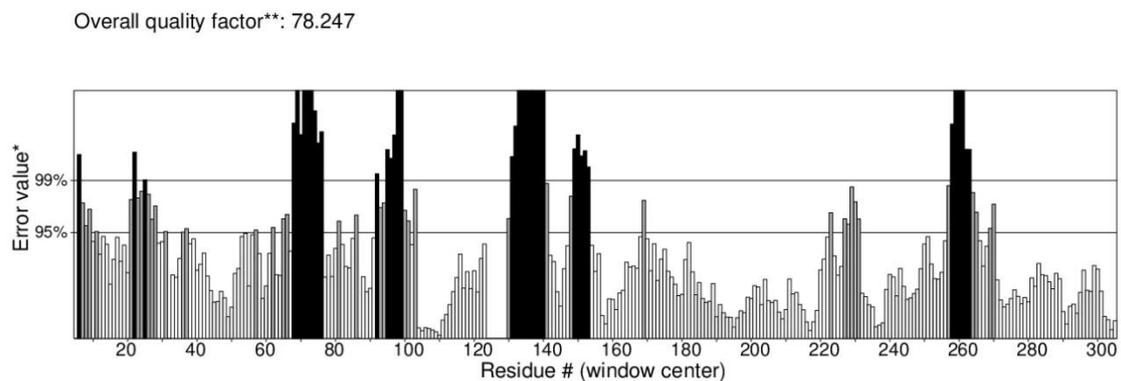
O programa Verify 3D foi utilizado para identificar a associação entre a estrutura 3D com sua própria sequência de aminoácidos 1D. O ranqueamento de compatibilidade acima de zero no gráfico VERIFY-3D (90,94% dos resíduos possuem pontuação média 3D - 1D = 0,2), que corresponde a ambientes de aceitabilidade de cadeia lateral de modelos construídos (Figura 6), como para o modelo de DDX3 obtido pelo MODELLER 9 v. 20 (EISENBERG, 1997). Portanto, ao considerar o parâmetro de compatibilidade observa-se a confirmação da precisão do modelo.

Figura 6. Gráfico da associação entre a estrutura 3D e a sequência de aminoácidos em 1D para DDX3h gerado pelo software Verify 3D.



O processo de validação do modelo obtido seguiu a aplicação de outro programa computacional, o ERRAT, que verifica se há interações atômicas não ligadas ou desconectadas entre os átomos da proteína construída. Este software exerce avaliação baseada no fator de qualidade global, considerando que um valor maior que 50%, é aceitável para sugerir que o modelo em questão apresenta alta qualidade (COLOVOS, 1993). O fator atingido pelo modelo previsto foi 78,2468% e o gráfico obtido é demonstrado na Figura 7. Estes resultados validam, assim, a qualidade do modelo gerado.

Figura 7. Fator de qualidade global realizada por ERRAT.



*No eixo de erro, duas linhas são desenhadas para indicar a confiança com a qual é possível rejeitar regiões que excedam esse valor de erro.

**Expresso como a porcentagem da proteína para a qual o valor de erro calculado cai abaixo do limite de 95% de rejeição. Boas estruturas de alta resolução geralmente produzem valores em torno de 95% ou mais. Para resoluções mais baixas (2,5 a 3Å), o fator de qualidade geral médio é de cerca de 91%.

3.2.4 Análise da estrutura secundária

A análise da estrutura secundária é utilizada para identificar se um determinado aminoácido está em forma de uma hélice ou de bobina. Esse método é destinado para prever a estrutura e a função das proteínas. Para esta etapa foi utilizado o software SOPMA de predição de estruturas secundárias (GEOURJON; DELEAGE, 1995). As características estruturais secundárias, conforme previsto estão representadas na tabela 5 e figura 8. A estrutura secundária foi prevista usando parâmetros padrão de análise como largura da janela: 17, limite de similaridade: 8 e número de estados: 4.

Tabela 5. Elementos de estrutura secundária da DDX3h calculada pelo software SOPMA.

Estrutura	Número de Resíduos	Porcentagem (%)
Alpha helix [Hh]:	184	27.79
310 helix [Gg]:	0	0.00
Pi helix [Ii]:	0	0.00
Beta bridge [Bb]:	0	0.00
Extended strand [Ee]:	95	14.35
Beta turn [Tt]:	41	6.19
Bend region [Ss]:	0	0.00
Random coil [Cc]:	342	51.66
Ambiguous states [?]:	0	0.00
Other states:	0	0.00

Análise da estrutura secundária da DDX3 modelada realizada por SOPMA revela que o modelo contém 27,79% de alfa hélice, 14,35% de cadeia estendida, 51,66% de bobina aleatória e 6,19% de voltas (Tabela 5). A prevalência de regiões enroladas indica a estabilidade do modelo teórico e o elevado nível de conservação (NEELAMATHI; BAGYALAKSHMI; KANNAN, 2009).

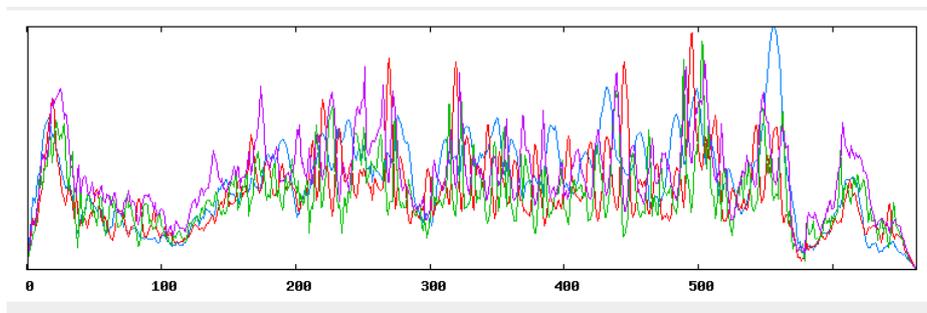


Figura 8: Estrutura secundária da DDX3 modelada. Aqui, hélice, fios estendidos e voltas beta são indicados por azul, vermelho e verde, respectivamente.

Os resultados obtidos permitem sugerir que o melhor modelo gerado e submetido à processos de validação, pode ser utilizado para estudos de interação entre compostos bioativos e o receptor, empregado em processos de planejamento de fármacos novos.

3.2.5 Ancoramento molecular

As tabelas 6 e 7 mostram as energias livres mínimas obtidas para o tidiazuron de -6,14 kcal/mol e para o cetoprofeno -7,19 kcal/mol. No entanto, a conformação que atingiu -5,62 kcal/mol do composto tidiazuron ancorado foi mantida para análise posterior. O critério para reter este complexo ancorado foi à interação com os resíduos PHE357 e THR323, que são importantes para a interação com o receptor. A conformação número 1 do tidiazuron apresentou interações com os resíduos de aminoácidos PRO 274, THR 275, ARG 276, GLY 302, GLY 325, PHE 357, GLN 477, ARG 480, GLY 504, ASP 506 e o modelo gerado por homologia molecular. Da mesma forma, o cetoprofeno apresentou interações com os resíduos de aminoácidos PRO 274, GLY 302, ARG 326, THR 323, GLY 325, PHE 357, GLN 477, ARG 480, GLY 504, ASP 506 e a DDX3h. As energias de ligação revelaram forte capacidade de ligação dos compostos aos resíduos de aminoácidos catalíticos da enzima. A eficiência do ligante predita para o cetoprofeno e tidiazuron foram de 0,37 e 0,45, respectivamente. Os valores de ranqueamento (*scores*) de eficiência do ligante avaliam a ligação do ligante ao receptor, isso depende da energia de ligação do ligante e é diretamente proporcional a interação predita. Neste cenário, a eficiência do ligante de 0,3 foi declarada como suficiente para um composto ser semelhante à um fármaco (ABAD-ZAPATERO et al., 2010).

Os valores da constante de inibição preditos foram de 76.12 μM para o tidiazuron e 5.32 μM para o cetoprofeno. Estas pontuações de constante de inibição indicam inibição da enzima por ambos os ligandos, entretanto o tidiazuron apresentou pontuação de inibição mais elevada (tabela 6) o que resulta em menor potência em relação ao fármaco estudado. Os valores da constante de inibição representam uma reação de dissociação e, portanto, seus valores são positivos (GHANTA et al., 2018).

Tabela 6. Resultados de interação do tidiazuron com o modelo DDX3h.

Conformação	Resíduos de aminoácidos	Energia de interação (kcal/mol)	Constante de inibição uM	Energia VDW_HB desolv (kcal/mol)	Eficiência do ligante
1	PRO274,PHE357,GLY504, THR275, GLY325, ARG480, ASP506, ARG276, GLN477, GLY302	-5.62	76.12	-6.15	-0.37
2	THR384, ALA383, ASP350,SER 412, ASP354, GLU348, ARG351	-5.88	48.88	-6.39	-0.39
3	PRO274, PHE357,GLY504,THR275,GLY325,THR 323,ASP506,GLY302,GLN477,ARG276	-5.57	82.24	-6.11	-0.37
4	ALA383,THR384,ASP350,SER412,GLN 225,ASP354,ARG351,ILE415,GLY530	-5.97	41.94	-6.33	-0.4
5	ARG363,LEU392,GLU358,LEU353,GL U388	-4.99	219.36	-5.46	-0.33
6	ALA383,ASP350,VAL526,THR384,SER 412,GLN225,THR411,ASP354,ILE529,V AL526	-5.57	83.04	-6.08	-0.37
7	ALA383,ASP350,VAL526,THR384,SER 412,GLN225,THR411,ASP354,ILE529,V AL526	-6.14	31.05	-6.37	-0.41
8	ALA383,ASP350,VAL526,THR384,SER 412,GLN225,THR411,ASP354,ILE529,V AL526	-5.61	76.86	-6.17	-0.37
9	ALA383,ASP350,VAL526,THR384,SER 412,GLN225,THR411,ASP354,ILE529,V AL526	-5.6	78.55	-6.13	-0.37
10	ALA383,ASP350,VAL526,THR384,SER 412,GLN225,THR411,ASP354,ILE529,V AL526	-5.62	75.39	-6.18	-0.37

Tabela 7. Resultados de interação do cetoprofeno com o modelo DDX3h.

Conformação	Resíduos de aminoácidos	Energia de interação (kcal/mol)	Constante de inibição uM	Energia VDW_HB desolv (kcal/mol)	Eficiência do ligante
1	ARG503, GLY504, GLY302, ARG326, ARG480, GLY303, GLN477	-5.8	55.75	-5.89	-0.31
2	ARG276, ASP506, THR323, THR275, GLY504, PHE357, GLY302, GLN477, ARG480	-6.42	19.57	-7.18	-0.34
3	ARG326, GLY303, GLY302, GLN477, ARG276, ARG480, GLY325, GLY504, ARG276, THR323, ASP506	-6.28	25.12	-6.47	-0.33
4	GLY302, GLY325, ARG480, GLY504, PHE357, GLN360, GLY356, ARG503	-5.81	55.51	-6.46	-0.31
5	ARG276, ASP506, THR323, THR275, MET355, PHE357, ARG326, GLY303, GLN477, GLY302, ARG480, LEU505, GLY325, GLY504	-6.45	18.66	-6.69	-0.34
6	THR226, LYS230, GLU348, ARG351, ALA383, GLN225, ASP350, THR384, SER412, ASP354, ILE415, GLY530, VAL526	-7.1	6.28	-8.66	-0.37
7	PRO274, THR275, THR323, ASP506, PHE357, GLY325, GLY504, ARG276, GLY302, GLN477, GLY303, ARG326	-7.12	6.08	-7.34	-0.37
8	THR323, PHE357, GLY504, GLY325, GLN477, GLY302, GLY303, ARG326, ARG480, ASP506, PRO274	-7.0	7.33	-7.02	-0.37
9	THR323, PHE357, GLY504, GLY325, GLN477, GLY302, GLY303, ARG326, ARG276, ASP506, THR275	-7.18	5.43	-7.41	-0.38
10	ASP506, THR323, PHE357, GLY504, GLY325, GLN477, GLY302, ARG326, ARG480, PRO274	-7.19	5.32	-7.66	-0.38

Os resultados revelaram que a ligação dos compostos foi estabilizada por interações hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio com o envolvimento de resíduos críticos do local de ligação do RNA, ou seja, ARG276, THR 323, GLY 302, ARG 326, PHE 357, ARG 480 (figura 9 e 10). Assim, pode-se observar que os resíduos do modelo de DDX3, que estão envolvidos na ligação com o RNA, também interagem com diferentes inibidores através de interações hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio (FAZI et al., 2015). Este fato é importante uma vez que o local de ligação do RNA de DEAD-BOX DDX3 humana é composto de fendas e resíduos hidrofóbicos com capacidade de ligação de hidrogênio (RADI et al., 2012).

Figura 9. Modelos de interação DDX3h-ligante molecular do cetoprofeno no local do sítio ativo.

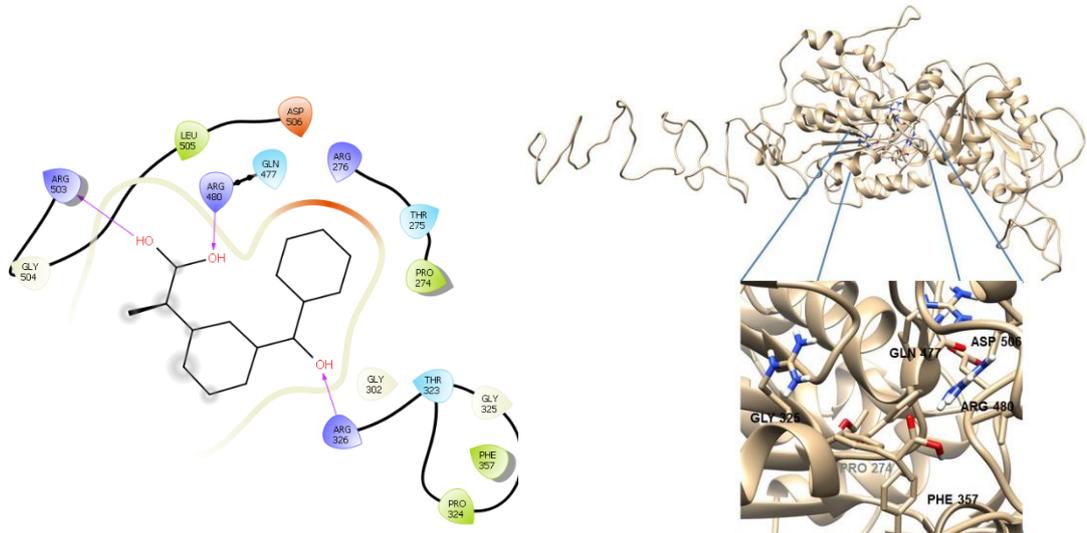
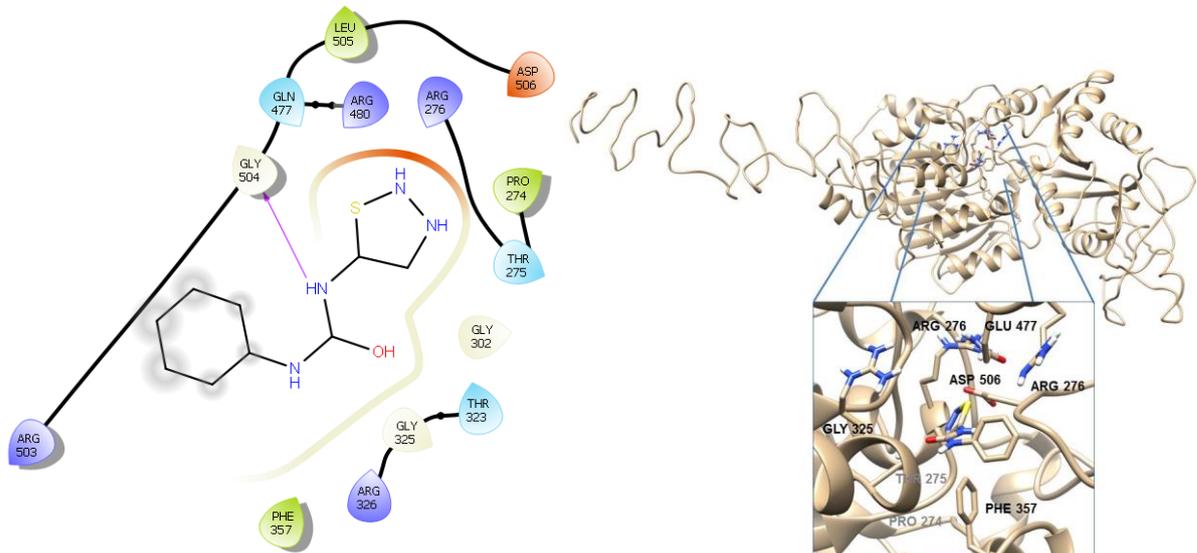


Figura 10. Modelos de interação DDX3h-ligante molecular do tidiazuron no local do sítio ativo.



A estrutura de uma helicase ativa pode ser amplamente dividida em uma conformação aberta e fechada, com uma transição entre os dois estados em cada ciclo catalítico dependendo da ligação de ATP e RNA, considerada semi-fechada. Uma vez ligada ao ATP, a helicase adota uma conformação de ligação de RNA fechada. O mecanismo geral para a abertura do sítio de ligação ao RNA foi proposto por SCHUTZ *et. al.* (2010), após a ligação do ATP, o domínio helicase 2 gira aproximadamente 180° em relação ao domínio protéico 1 gerando uma estrutura fechada que então muda para uma conformação de RNA competente após o movimento do RNA α -hélice 8. A hidrólise de ATP muda a hélice α -8 de volta à conformação original, permitindo a liberação do substrato de RNA. Esta observação, juntamente com a presença de um resíduo conservado perto desta hélice (THR 323), essencial para a atividade da helicase, sugeriu que um inibidor capaz de atingir este sítio poderia bloquear a helicase DDX3 em uma conformação cataliticamente inativa (uma ligação pré-RNA conformação) (SCHÜTZ *et al.*, 2010). Um estudo de ancoramento conduzido por Radi *et.al.* (2015) sugeriu os primeiros inibidores de moléculas pequenas da replicação do HIV-1 que foram obtidos especificamente para alcançar o local de ligação ao RNA da DDX3 humana. Sabendo-se que os potenciais sítios catalíticos e de ligação do RNA estão próximos dos resíduos PHE 357 e THR 323, foi realizada ancoramento específico com caixa de grade de pontos (GRID) que cobre os principais resíduos envolvidos na atividade da helicase DDX3. Os compostos avaliados apresentaram interações com resíduos comuns aos inibidores já validados em outros estudos, PHE 357 e THR 323, no sítio ativo da enzima, o que permitiria sugerir serem estes compostos capazes de inibi-la ao interferir na ligação do RNA na DDX3 modelada.

3.2.6 Predição de propriedades físico-químicas e toxicológicas

Na triagem de novas substâncias ativas, as abordagens computacionais permitem estimar propriedades físico-químicas que afetam a solubilidade e a permeabilidade em sistemas físicos e biológicos e que podem ser importantes no processo de descoberta de fármacos e no desenvolvimento de medicamentos (LIPINSKI *et al.*, 2001). Propriedades envolvidas em fatores farmacocinéticos em sistemas biológicos humanos podem qualificar ou desqualificar o desenvolvimento de um composto e seu andamento no decorrer de ensaios pré-clínicos e clínicos (MABKHOT *et al.*, 2016). O desenvolvimento de fármacos envolve processos de alto custo e tem demanda de tempo elevado para sua conclusão, e neste cenário a predição de

propriedades é etapa relevante que pode reduzir os montantes gastos e o tempo envolvido. Sendo assim, os compostos foram submetidos à ferramenta de predição de propriedades físicas e moleculares fornecida pelo Osiris Property Explorer que é capaz de prever o perfil *Druglikeness* e *Drugscore* de novos compostos.

O *score* de bioatividade dos compostos foram calculados pelo software Molinspiration Chemoinformatics, para os possíveis alvos de fármacos, incluindo inibidor enzimático, receptores nucleares, inibidores de quinase, ligantes de receptores acoplados a proteína G - GPCR e moduladores de canal iônico. Os resultados das propriedades físico-químicas e a previsão dos riscos de toxicidade dos compostos estudados neste trabalho, são apresentados na Tabela 8 e 9, respectivamente. O cálculo realizado pelo Osiris indicou risco de toxicidade teórico alto para o sistema reprodutivo, esse alerta aponta que a estrutura química desenhada do composto tidiazuron, apresenta fragmentos estruturais relacionados a moléculas conhecidos por serem ativos nesta categoria de toxicidade. Por outro lado, apontou ser seguro para os demais parâmetros, porém a ausência de alertas não conclui que a molécula está completamente isenta de provocar efeitos tóxicos em relação à mutagenicidade, irritação, tumorigenicidade, por se tratar de uma previsão teórica espera-se que demonstre baixo ou nenhum efeito indesejado (SANDER et al., 2009). A previsão do potencial de toxicidade pelo programa é validada com base na semelhança do composto investigado com cerca de 7000 moléculas de fármacos disponíveis em banco de dados (MABKHOT et al., 2016). Os compostos mostraram ser compatíveis com a regra de Lipinski, dado que não apresentaram nenhuma violação. De acordo com a regra dos cinco, um composto promissor para apresentar adequada biodisponibilidade oral prevê os limites de peso molecular ≤ 500 g/mol, $cLogP \leq 5$, número de átomos doadores de H ≤ 5 e número de aceptores de ligação de H ≤ 10 . Diante do exposto, é provável que os compostos apresentem bom comportamento farmacocinético, entre estes, boa solubilidade em solventes aquosos e permeabilidade entre membranas. De fato, como avaliado pelos parâmetros, os compostos revelaram resultados que impactam diretamente sobre biodisponibilidade, como $cLogP \leq 5$ e coeficiente de solubilidade $cLogS \leq -4$ (LIPINSKI et al., 2001; SANDER et al., 2009).

Tabela 8: Propriedades físico-químicas calculadas com o uso de software Molinspiration Chemoinformatics.

	Propriedades	Tidiazuron	Cetoprofeno
1	Peso molecular (g/mol)	220.256	253.276
2	cLogP	1.9214	0.6243
3	cLogS	-3.431	-4.062
4	Aceptor ligação H	5	3
5	Doador ligação H	2	0
6	n° de violações	0	0
7	TPSA	66.91	57.20
8	n° de rotações	2	4

Tabela 9: Propriedades de previsão dos riscos de toxicidade calculadas com o uso de software Osiris

	Propriedades	Tidiazuron	Cetoprofeno
1	Drug likeliness	-3.7319	0.27238
2	Mutagênica	none	none
3	Tumorigênica	none	none
4	Efeito sobre sistema reprodutivo	high	none
5	Irritante	none	none
6	Drug Score	0.26976644110022	0.6529271862035491

A Tabela 10 descreve os *scores* de bioatividade para os compostos propostos como potenciais inibidores e DDX3 e antivirais potenciais. Nas condições estabelecidas se considera que quanto maior o valor da pontuação, maior a probabilidade da molécula específica ser ativa (KANDAKATLA et al., 2015). Contudo, presume-se que o composto estudado seja moderadamente ativo, pois atingiu uma pontuação entre -5,0 a 0,0 (tabela 2). Destaca-se o resultado obtido para inibição enzimática, o tidiazuron atingiu uma pontuação de -0.03. Uma vez que, a DDX3 exibe atividade enzimática, este dado colabora com a hipótese desta molécula atuar como seu potencial inibidor (RADI et al., 2012). Dessa forma, a molécula investigada poderia produzir ações fisiológicas pela interação com os demais alvos celulares.

Tabela 10. Pontuação de avaliação da bioatividade calculada pelo software Molinspiration Chemoinformatics.

Composto	Atividades Preditas pelo Software/Score					
	LGPCR ^a	MCI ^b	IQ ^c	LRN ^d	IP ^e	IE ^f
Tidiazuron	-0.65	-0.80	-0.14	-1,25	-0.83	-0.03
Cetoprofeno	-0.06	-0.00	-0.11	0.09	-0.25	0.05
^a LGPCR:	Ligante de receptor acoplado a proteína G					
^b MCI:	Modulador de canais iônicos					
^c IQ:	Inibidor da quinase					
^d LRN:	Ligante do receptor nuclear					
^e IP:	Inibidor de protease					
^f IE:	Inibidor enzimático					

4 CONCLUSÃO

Devido a relevância da helicase DDX3 como alvo de intervenção farmacológica contra ameaças humanas que causam grande impacto na saúde, informações sobre o seu sítio ativo que visam melhorar o entendimento dessa interação, é fundamental para o desenvolvimento moléculas que possam inibir sua atividade e consequentemente interferir na replicação viral. Neste estudo, a estrutura tridimensional da helicase DDX3 em sua conformação fechada foi construída, prevista e validada por várias ferramentas e softwares de modelagem molecular. Os modelos selecionados mostraram alta homologia em comparação à sequência proteica da DEAD-BOX DDX3 humana (identidade PDB: 5e7i-100% e PDB: 2DB3-49%). Desta maneira, projetamos com sucesso a estrutura 3D da DDX3, que provou ser um modelo de alta qualidade baseado no gráfico de Ramachandran, e nos parâmetros estatísticos de validação dos softwares Verify 3D e ERRAT, que confirmam a confiabilidade da estrutura gerada. Neste cenário, verificou-se que resíduos PHE 357 e THR 323 do domínio de ligação ao RNA de DDX3 foram considerados como resíduos chave na ligação com compostos biotivos. Estes resíduos foram totalmente conservados em sequências dos modelos, como mostrado pelo estudo de alinhamento de sequência alvo e modelos. Os resultados de acoplamento dos compostos tidiazuron e cetoprofeno, inibidores potenciais da citada proteína, revelaram sua atuação no mesmo compartimento de ligação de inibidores da helicase DDX3 padrão já validados. Os compostos alvos deste estudo criaram ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com esses importantes aminoácidos.

O modelo predito de DDX3 pode ser útil nos estudos de inibição da ligação do RNA no sítio ativo desta helicase. Este trabalho representa a proposta de descoberta de potenciais inibidores da DDX3 e sugestão da avaliação de sua atividade antiviral contra vírus que utilizam

esta helicase para seus processos de replicação. Essas moléculas ainda não foram descritas como antivirais ou inibidoras de DDX3, o que torna sua novidade interessante para caracterizá-los como novos candidatos a fármacos eficazes contra as infecções virais tendo a DDX3 como alvo. Os compostos foram submetidos à avaliação de propriedades físico-químicas características de outros fármacos disponíveis no mercado, e de sua provável toxicidade, e apresentaram valores que sugerem bom perfil farmacêutico de absorção por difusão passiva, drugscore e baixo risco de causar toxicidade.

5 REFERÊNCIAS

- ABAD-ZAPATERO, C. et al. **Ligand efficiency indices for an effective mapping of chemo-biological space: The concept of an atlas-like representation.** *Drug Discovery Today*, out. 2010.
- ANDRADE, O.; FILHO, S.; BICCA DE ALENCASTRO, R. MODELAGEM DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA. *Quim. Nova*, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.
- ARHEL, N.; KIRCHHOFF, F. **Host proteins involved in HIV infection: New therapeutic targets.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, mar. 2010.
- ARIUMI, Y. Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection. *Frontiers in Genetics*, v. 5, n. DEC, 2014.
- BARREIRO, E. J. et al. MODELAGEM MOLECULAR: UMA FERRAMENTA PARA O PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS EM QUÍMICA MEDICINAL. *Química Nova*, v. 20, n. 1, 1997.
- BEKERMAN, E.; EINAIV, S. **Combating emerging viral threats: Broad-spectrum antiviral drugs are under development to treat emerging viral diseases such as Ebola and dengue for which no specific, licensed treatments exist.** *ScienceAmerican Association for the Advancement of Science*, , 17 abr. 2015.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. W1, 1 jul. 2014.
- BRAI, A. et al. Human DDX3 protein is a valuable target to develop broad spectrum antiviral agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 19, p. 5388–5393, 10 maio 2016.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, v. 2, p. 1511–1519, 1993.
- DENG, H.; JIA, Y.; ZHANG, Y. Protein structure prediction. *International Journal of Modern Physics B*, v. 32, n. 18, 20 jul. 2018.
- DEWIR, Y. H. et al. **Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures.** *Plant Cell Reports*Springer Verlag, , 1 nov. 2018.
- EISENBERG, D.; LOTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles. *Methods in enzymology*, v. 277, 1997.
- ERICKSON, J. A. et al. Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 1, p. 45–55, 1 jan. 2004.
- ESWAR, N. et al. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 13, p. 3375–3380, 1 jul. 2003.

FAZI, R. et al. Homology Model-Based Virtual Screening for the Identification of Human Helicase DDX3 Inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 11, p. 2443–2454, 23 nov. 2015.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. **Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. Cell Host and Microbe**, 23 abr. 2009.

FISER, A.; SALI, A. ModLoop: Automated modeling of loops in protein structures. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2500–2501, 12 dez. 2003.

FLOOR, S. N. et al. Autoinhibitory interdomain interactions and subfamilyspecific extensions redefine the catalytic core of the human DEAD-box protein DDX3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 5, p. 2412–2421, 29 jan. 2016.

GABOR, F. et al. Ketoprofen-poly microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. **Jornal of microencapsulation**, v. 16, p. 1–12, 1999.

GARBELLI, A. et al. Targeting the Human DEAD-Box Polypeptide 3 (DDX3) RNA Helicase as a Novel Strategy to Inhibit Viral Replication. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3015–3027, 2011.

GEOURJON, C.; DELEAGE, G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **CABIOS**, v. 11, p. 681–684, 1995.

GHANTA, M. et al. Molecular docking analysis of phytoconstituent from *Momordica charantia* with Guanylate Cyclase catalytic domain. **Bioinformation**, v. 14, n. 07, p. 378–383, 31 jul. 2018.

GUL, R. et al. Biodegradable Ingredient-Based Emulgel Loaded with Ketoprofen Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1869–1881, 1 maio 2018.

GUO, B. et al. **Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. African Journal of Biotechnology** Academic Journals, , 2011.

HARE, P. D.; VAN STADEN, J. Inhibitory Effect of Thidiazuron on the Activity of Cytokinin Oxidase Isolated from Soybean Callus. **Plant CellPhysiol**, v. 35, n. 8, p. 1121–1125, 1994.

HAWKEY, C. J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 15, n. 5, p. 801–820, 2001.

HORGAN, R.; BURCH, L. R.; PALNI, L. M. S. Cytokinin Oxidase and the Degradative Metabolism of Cytokinins. **Plant Growth Substances**, 1988.

JEFFERSON, M. et al. Host Factors That Interact with the Pestivirus N-Terminal Protease, N pro , Are Components of the Ribonucleoprotein Complex . **Journal of Virology**, v. 88, n. 18, p. 10340–10353, 15 set. 2014.

KANDAKATLA, N. et al. IN SILICO STUDIES ON NEW INDAZOLE DERIVATIVES AS GSK-3 β INHIBITORS. **Article in International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2015.

KHAN, F. et al. Modern Methods & Web Resources in Drug Design & Discovery. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 8, p. 469–490, 2011.

KHODDAMI, M. et al. Homology modeling, molecular dynamic simulation, and docking based binding site analysis of human dopamine (D4) receptor. **Journal of Molecular Modeling**, v. 21, n. 2, 1 fev. 2015.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3–26, 2001.

LOU, Z.; SUN, Y.; RAO, Z. **Current progress in antiviral strategies. Trends in Pharmacological Sciences**, fev. 2014.

MABKHOT, Y. N. et al. Antimicrobial activity of some novel armed thiophene derivatives and petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses. **Molecules**, v. 21, n. 2, 1 fev. 2016.

MALFAIT, A. M.; SCHNITZER, T. J. **Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. Nature Reviews Rheumatology**, nov. 2013.

MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

NEELAMATHI, E.; BAGYALAKSHMI, S. A.; KANNAN, R. INSILICO PREDICTION OF STRUCTURE AND FUNCTIONAL ASPECTS OF A HYPOTHETICAL PROTEIN OF NEUROSPORA CRASSA. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 9, n. 3, p. 1889–1894, 2009.

NOBLE, C. G. et al. Ligand-Bound Structures of the Dengue Virus Protease Reveal the Active Conformation. **Journal of Virology**, v. 86, n. 1, p. 438–446, jan. 2012.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

RADI, M. et al. Discovery of the first small molecule inhibitor of human DDX3 specifically designed to target the RNA binding site: Towards the next generation HIV-1 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 5, p. 2094–2098, 1 mar. 2012.

ROMAN LASKOWSKI, B. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. Computer Programs PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Phys. Status Solidi B**, v. 13, p. 283–291, 1983.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010.

SAKHTEMAN, A.; ZARE, B. Modelface: an Application Programming Interface (API) for Homology Modeling Studies Using Modeller Software. **Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 801–807, 2016.

SALI, A. et al. Evaluation of Comparative Protein Modeling by MODELLER. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 23, p. 318–326, 1995.

SAMAL, S. K. et al. Ketorolac salt is a newly discovered DDX3 inhibitor to treat oral cancer. **Scientific Reports**, v. 5, 28 abr. 2015.

SANDER, T. et al. OSIRIS, an entirely in-house developed drug discovery informatics system. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 232–246, 23 fev. 2009.

SCHÜTZ, P. et al. Comparative structural analysis of human DEAD-Box RNA helicases. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–11, 2010.

SHEN, Y.; BAX, A. Homology modeling of larger proteins guided by chemical shifts. **Nature Methods**, v. 12, n. 8, p. 747–750, 30 jul. 2015.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, 2011.

TINTORI, C. et al. **Protein-protein interactions and human cellular cofactors as new targets for HIV therapy. Current Opinion in Pharmacology** Elsevier Ltd, , 2014.

TONELLI, M. et al. Pharmacophore modeling, resistant mutant isolation, docking, and MM-PBSA analysis: Combined experimental/computer-assisted approaches to identify new inhibitors of the bovine viral diarrhea virus (BVDV). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 2304–2316, 15 mar. 2010.

VALIENTE-ECHEVERRÍA, F.; HERMOSO, M. A.; SOTO-RIFO, R. **RNA helicase DDX3: At the crossroad of viral replication and antiviral immunity. Reviews in Medical Virology** John Wiley and Sons Ltd, , 1 set. 2015.

VANLEERDAM, M. et al. Acute upper GI bleeding: did anything change? **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 7, p. 1494–1499, jul. 2003.

VIDAL, C. et al. EFFECT OF PREHARVEST SPRAYING WITH THIDIAZURON ON FRUIT QUALITY AND MATURITY OF APPLES 1 EFEITOS DA PULVERIZAÇÃO PRÉ-COLHEITA COM THIDIAZURON SOBRE A QUALIDADE E A MATUREZA DE FRUTOS EM MACIEIRAS. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal-SP**, n. 1, p. 59–62, 2003.

VOILLEY, N. et al. Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Both the Activity and the Inflammation-Induced Expression of Acid-Sensing Ion Channels in Nociceptors. **The journal of neuroscience**, v. 21, n. outubro, p. 8026–8033, 2001.

WANG, J. et al. Computational Study Exploring the Interaction Mechanism of Benzimidazole Derivatives as Potent Cattle Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 29, p. 5941–5950, 27 jul. 2016.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, p. 5.6.1-5.6.37, 2016.

ZHANG, Z. et al. Identification, Synthesis, and Safety Assessment of Thidiazuron [1-Phenyl-3-(1,2,3-thiazol-5-yl)urea] and Its Metabolites in Kiwifruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 51, p. 11273–11279, 27 dez. 2017.

6 DISCUSSÃO GERAL

A maioria das abordagens terapêuticas atuais usadas para o tratamento de infecções virais e das doenças causadas por estes envolve o uso de substâncias que atuam diretamente em alvos do vírus ou das organelas, proteínas ou ácidos nucleicos da célula hospedeira. Embora terapeuticamente bem sucedidos, muitos podem perder a eficiência devido ao surgimento de resistência aos medicamentos, ou apresentam efeitos tóxicos (BEKERMAN; EINAV, 2015; LOU; SUN; RAO, 2014). Estudos recentes têm relatado diversos fatores do hospedeiro, como enzimas, receptores, organelas, que são importantes para a replicação de alguns vírus. Nesta perspectiva, cofatores celulares envolvidos na reprodução de vírus representam uma abordagem terapêutica promissora na pesquisa de substâncias com atividade antiviral. Até o momento, uma estrutura tridimensional da conformação fechada determinada experimentalmente da helicase DDX3 não está disponível, inviabilizando estudos de potenciais inibidores da ligação do RNA. Desta forma, a estrutura 3D da DDX3 humana ligada ao RNA (conformação fechada) foi obtida por modelagem de homologia neste trabalho. No presente trabalho, selecionamos 2 ligantes (tidiazuron e cetoprofeno) para os estudos de ancoramento molecular, baseados na semelhança estrutural com inibidores da DDX3 já estabelecidos. Não há estudos descritos na literatura que relacionem as substâncias tidiazuron e cetoprofeno com ação de inibição da proteína do hospedeiro DDX3 envolvida na replicação de vírus.

A modelagem consistiu em comparar a sequência de destino submetida com as estruturas disponíveis no banco de dados do Protein Data Bank (PDB), e a pesquisa foi realizada por meio do programa BLAST. As estruturas tridimensionais selecionadas como modelos foram a RNA helicase da *Drosophila vasa* DEAD-box (código PDB: 2DB3) com resolução de 2,20 Å, que foi cristalizada em sua conformação fechada ligada ao RNA. A estrutura 2DB3 demonstrou uma similaridade de sequência de aminoácidos de 49% com o DDX3 humano. A estrutura cristalina da conformação aberta de DDX3 humana (código PDB: 5E7I) foi usada como segundo modelo para preencher os resíduos pertencentes ao motivo único de DDX3, que estão faltando na estrutura do 2DB3 (FAZI et al., 2015). A sequência alvo da helicase DDX3, descrita em código de número de acesso: Uniprot- O00571, foi alinhada com a estrutura cristalográfica da helicase DDX3 humana que foi cristalizada em sua conformação pré-fechada de ligação ao RNA (PDB: 5E7I), usada como primeiro modelo e com a *Drosophila vasa* (PDB: 2DB3) selecionada como segundo modelo. Para validação da estrutura prevista (O00571.BL000900001), sua qualidade foi avaliada usando vários programas computacionais.

Esses resultados apontaram que as propriedades estereoquímicas gerais do modelo construído foram altamente confiáveis e o modelo pode ser útil para subsequentes estudos de modelagem molecular.

Sabendo-se que os potenciais sítios catalíticos e de ligação do RNA estão próximos dos resíduos PHE 357 e THR 323, foi realizada ancoramento específico com caixa de grade de pontos (GRID) que cobre os principais resíduos envolvidos na atividade da helicase DDX3. Os compostos avaliados apresentaram interações com resíduos comuns aos inibidores já validados em outros estudos, PHE 357 e THR 323, no sítio ativo da enzima, o que permitiria sugerir serem estes compostos capazes de inibi-la ao interferir na ligação do RNA na DDX3 modelada.

Os compostos mostraram ser compatíveis com a regra de Lipinski, dado que não apresentaram nenhuma violação. Diante do exposto, é provável que os compostos apresentem bom comportamento farmacocinético, entre estes, boa solubilidade em solventes aquosos e permeabilidade entre membranas.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, a estrutura tridimensional da helicase DDX3 em sua conformação fechada foi construída, prevista e validada por várias ferramentas e softwares de modelagem molecular. Os modelos selecionados mostraram alta homologia em comparação à sequência proteica da DEAD-BOX DDX3 humana (identidade PDB: 5E7I-100% e PDB: 2DB3-49%). Desta maneira, projetamos com sucesso a estrutura 3D da DDX3, que provou ser um modelo de alta qualidade baseado no gráfico de Ramachandran, e nos parâmetros estatísticos de validação dos softwares Verify 3D e ERRAT. Neste cenário, verificou-se que resíduos PHE 357 e THR 323 do domínio de ligação ao RNA de DDX3 foram considerados como resíduos chave na ligação com compostos biotivos. Estes resíduos foram totalmente conservados em sequências dos modelos, como mostrado pelo estudo de alinhamento de sequência alvo e modelos. Os resultados de acoplamento dos compostos tidiazuron e cetoprofeno, inibidores potenciais da citada proteína, revelaram sua atuação no mesmo compartimento de ligação de inibidores da helicase DDX3 padrão já validados. Os compostos alvos deste estudo criaram ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com esses importantes aminoácidos.

O modelo predito de DDX3 pode ser útil nos estudos de inibição da ligação do RNA no sítio ativo desta helicase. Este trabalho representa a proposta de descoberta de potenciais inibidores da DDX3 e sugestão da avaliação de sua atividade antiviral contra vírus que utilizam esta helicase para seus processos de replicação. Essas moléculas ainda não foram descritas como antivirais ou inibidoras de DDX3, o que torna sua novidade interessante para caracterizá-los como novos candidatos a fármacos eficazes contra as infecções virais tendo a DDX3 como alvo. Os compostos foram submetidos à avaliação de propriedades físico-químicas características de outros fármacos disponíveis no mercado, e de sua provável toxicidade, e apresentaram valores que sugerem bom perfil farmacêutico de absorção por difusão passiva, drugscore e baixo risco de causar toxicidade.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a toxicidade *in vivo* das moléculas análise comportamental e histopatológica;
- Avaliar se os compostos podem combater infecções por arboviroses, uma vez que diferentes vírus utilizam DDX3 para sua replicação. Resultando em inibidores de amplo espectro viral;
- Avaliar por meio de uma curva dose-resposta a inibição da atividade da helicase DDX3 pelos compostos tidiazuron e cetoprofeno em concentrações crescentes de substrato de dsRNA;
- Avaliar parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção *in vivo* do composto tidiazuron.

9 REFERÊNCIAS

- ABAD-ZAPATERO, C. et al. **Ligand efficiency indices for an effective mapping of chemico-biological space: The concept of an atlas-like representation.** *Drug Discovery Today*, out. 2010.
- ANDRADE, O.; FILHO, S.; BICCA DE ALENCASTRO, R. MODELAGEM DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA. *Quim. Nova*, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.
- ARHEL, N.; KIRCHHOFF, F. **Host proteins involved in HIV infection: New therapeutic targets.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, mar. 2010.
- ARIUMI, Y. Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection. *Frontiers in Genetics*, v. 5, n. DEC, 2014.
- BARREIRO, E. J. et al. MODELAGEM MOLECULAR: UMA FERRAMENTA PARA O PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS EM QUÍMICA MEDICINAL. *Química Nova*, v. 20, n. 1, 1997.
- BEKERMAN, E.; EINAV, S. **Combating emerging viral threats: Broad-spectrum antiviral drugs are under development to treat emerging viral diseases such as Ebola and dengue for which no specific, licensed treatments exist.** *ScienceAmerican Association for the Advancement of Science*, , 17 abr. 2015.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. W1, 1 jul. 2014.
- BRAI, A. et al. Human DDX3 protein is a valuable target to develop broad spectrum antiviral agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 19, p. 5388–5393, 10 maio 2016.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science* , v. 2, p. 1511–1519, 1993.
- DENG, H.; JIA, Y.; ZHANG, Y. Protein structure prediction. *International Journal of Modern Physics B*, v. 32, n. 18, 20 jul. 2018.
- DEWIR, Y. H. et al. **Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures.** *Plant Cell Reports*Springer Verlag, , 1 nov. 2018.
- EISENBERG, D.; LOTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles. *Methods in enzymology*, v. 277, 1997.
- ERICKSON, J. A. et al. Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 1, p. 45–55, 1 jan. 2004.
- ESWAR, N. et al. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 13, p. 3375–3380, 1 jul. 2003.

FAZI, R. et al. Homology Model-Based Virtual Screening for the Identification of Human Helicase DDX3 Inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 11, p. 2443–2454, 23 nov. 2015.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. **Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell.** **Cell Host and Microbe**, 23 abr. 2009.

FISER, A.; SALI, A. ModLoop: Automated modeling of loops in protein structures. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2500–2501, 12 dez. 2003.

FLOOR, S. N. et al. Autoinhibitory interdomain interactions and subfamilyspecific extensions redefine the catalytic core of the human DEAD-box protein DDX3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 5, p. 2412–2421, 29 jan. 2016.

GABOR, F. et al. Ketoprofen-poly microspheres: influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. **Jornal of microencapsulation**, v. 16, p. 1–12, 1999.

GARBELLI, A. et al. Targeting the Human DEAD-Box Polypeptide 3 (DDX3) RNA Helicase as a Novel Strategy to Inhibit Viral Replication. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3015–3027, 2011.

GEOURJON, C.; DELEAGE, G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **CABIOS**, v. 11, p. 681–684, 1995.

GHANTA, M. et al. Molecular docking analysis of phytoconstituent from *Momordica charantia* with Guanylate Cyclase catalytic domain. **Bioinformation**, v. 14, n. 07, p. 378–383, 31 jul. 2018.

GUL, R. et al. Biodegradable Ingredient-Based Emulgel Loaded with Ketoprofen Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1869–1881, 1 maio 2018.

GUO, B. et al. **Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator.** **African Journal of Biotechnology** Academic Journals, , 2011.

HARE, P. D.; VAN STADEN, J. Inhibitory Effect of Thidiazuron on the Activity of Cytokinin Oxidase Isolated from Soybean Callus. **Plant CellPhysiol**, v. 35, n. 8, p. 1121–1125, 1994.

HAWKEY, C. J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 15, n. 5, p. 801–820, 2001.

HORGAN, R.; BURCH, L. R.; PALNI, L. M. S. Cytokinin Oxidase and the Degradative Metabolism of Cytokinins. **Plant Growth Substances**, 1988.

JEFFERSON, M. et al. Host Factors That Interact with the Pestivirus N-Terminal Protease, N pro , Are Components of the Ribonucleoprotein Complex . **Journal of Virology**, v. 88, n. 18, p. 10340–10353, 15 set. 2014.

KANDAKATLA, N. et al. IN SILICO STUDIES ON NEW INDAZOLE DERIVATIVES AS GSK-3 β INHIBITORS. **Article in International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2015.

KHAN, F. et al. Modern Methods & Web Resources in Drug Design & Discovery. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 8, p. 469–490, 2011.

KHODDAMI, M. et al. Homology modeling, molecular dynamic simulation, and docking based binding site analysis of human dopamine (D4) receptor. **Journal of Molecular Modeling**, v. 21, n. 2, 1 fev. 2015.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3–26, 2001.

LOU, Z.; SUN, Y.; RAO, Z. **Current progress in antiviral strategies. Trends in Pharmacological Sciences**, fev. 2014.

MABKHOT, Y. N. et al. Antimicrobial activity of some novel armed thiophene derivatives and petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses. **Molecules**, v. 21, n. 2, 1 fev. 2016.

MALFAIT, A. M.; SCHNITZER, T. J. **Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. Nature Reviews Rheumatology**, nov. 2013.

MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

NEELAMATHI, E.; BAGYALAKSHMI, S. A.; KANNAN, R. INSILICO PREDICTION OF STRUCTURE AND FUNCTIONAL ASPECTS OF A HYPOTHETICAL PROTEIN OF NEUROSPORA CRASSA. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 9, n. 3, p. 1889–1894, 2009.

NOBLE, C. G. et al. Ligand-Bound Structures of the Dengue Virus Protease Reveal the Active Conformation. **Journal of Virology**, v. 86, n. 1, p. 438–446, jan. 2012.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

RADI, M. et al. Discovery of the first small molecule inhibitor of human DDX3 specifically designed to target the RNA binding site: Towards the next generation HIV-1 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 5, p. 2094–2098, 1 mar. 2012.

ROMAN LASKOWSKI, B. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. Computer Programs PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Phys. Status Solidi B**, v. 13, p. 283–291, 1983.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010.

SAKHTEMAN, A.; ZARE, B. Modelface: an Application Programming Interface (API) for Homology Modeling Studies Using Modeller Software. **Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 801–807, 2016.

SALI, A. et al. Evaluation of Comparative Protein Modeling by MODELLER. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 23, p. 318–326, 1995.

SAMAL, S. K. et al. Ketorolac salt is a newly discovered DDX3 inhibitor to treat oral cancer. **Scientific Reports**, v. 5, 28 abr. 2015.

SANDER, T. et al. OSIRIS, an entirely in-house developed drug discovery informatics system. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 2, p. 232–246, 23 fev. 2009.

SCHÜTZ, P. et al. Comparative structural analysis of human DEAD-Box RNA helicases. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–11, 2010.

SHEN, Y.; BAX, A. Homology modeling of larger proteins guided by chemical shifts. **Nature Methods**, v. 12, n. 8, p. 747–750, 30 jul. 2015.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, 2011.

TINTORI, C. et al. **Protein-protein interactions and human cellular cofactors as new targets for HIV therapy. Current Opinion in Pharmacology** Elsevier Ltd, , 2014.

TONELLI, M. et al. Pharmacophore modeling, resistant mutant isolation, docking, and MM-PBSA analysis: Combined experimental/computer-assisted approaches to identify new inhibitors of the bovine viral diarrhea virus (BVDV). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 2304–2316, 15 mar. 2010.

VALIENTE-ECHEVERRÍA, F.; HERMOSO, M. A.; SOTO-RIFO, R. **RNA helicase DDX3: At the crossroad of viral replication and antiviral immunity. Reviews in Medical Virology** John Wiley and Sons Ltd, , 1 set. 2015.

VANLEERDAM, M. et al. Acute upper GI bleeding: did anything change? **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 7, p. 1494–1499, jul. 2003.

VIDAL, C. et al. EFFECT OF PREHARVEST SPRAYING WITH THIDIAZURON ON FRUIT QUALITY AND MATURITY OF APPLES 1 EFEITOS DA PULVERIZAÇÃO PRÉ-COLHEITA COM THIDIAZURON SOBRE A QUALIDADE E A MATUREZA DE FRUTOS EM MACIEIRAS. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal-SP**, n. 1, p. 59–62, 2003.

VOILLEY, N. et al. Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Both the Activity and the Inflammation-Induced Expression of Acid-Sensing Ion Channels in Nociceptors. **The journal of neuroscience**, v. 21, n. outubro, p. 8026–8033, 2001.

WANG, J. et al. Computational Study Exploring the Interaction Mechanism of Benzimidazole Derivatives as Potent Cattle Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 29, p. 5941–5950, 27 jul. 2016.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, p. 5.6.1-5.6.37, 2016.

ZHANG, Z. et al. Identification, Synthesis, and Safety Assessment of Thidiazuron [1-Phenyl-3-(1,2,3-thiazol-5-yl)urea] and Its Metabolites in Kiwifruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 51, p. 11273–11279, 27 dez. 2017.

10 ANEXOS

ANEXO 1

Normas revista *Bioinformatics*.

BIOINFORMATION
Discovery at the interface of physical and biological sciences

Indexed in
EMERGING
SOURCES
CITATION
WEB OF SCIENCE
Clarivate
analytics

PubMed
Central

Home About Us Editorial Guidelines Contact Submit

Archives

AUTHOR GUIDELINES

- Please follow the author guidelines carefully.
- All submissions should strictly be prepared per author guidelines to avoid processing delay.
- Manuscripts will be returned immediately if it is NOT formatted as per author guidelines.

Preparing manuscript text

File formats
The following file formats are acceptable:

- PDF (Adobe Acrobat).
- Microsoft Word File format
- TIFF image file format

Article types
When submitting your manuscript, you will be asked to assign one of the following types to your article:

- Hypothesis (2500 words, 1 illustration and/or 1 table)
- Current trends (1500 words, 1 illustration and/or 1 table)
- Views and challenges (1000 words and 1 illustration)
- Prediction models (2000 words, 1 illustration and/or 1 table)
- Web database (1000 words and 1 illustration)
- Web dataset (1000 words and 1 illustration)
- Stand alone software (1000 words and 1 illustration)
- Web server/software (1000 words and 1 illustration)
- Bioinformatics programs (1000 words and 1 illustration)

Please note that an additional illustration is allowed for a table. The journal prefer illustrations to tables. However,

relaxation of general rules is encouraged where required.

Word count
We recommend authors to comply with the word count. However, relaxation on word limit is allowed when reasonably justified.

Descriptions
Please read the descriptions for each of the article types, choose which is appropriate for your article and structure it accordingly.

Manuscript sections for articles types
Manuscripts for article types submitted to BIOINFORMATION should be divided as under:

- **Hypothesis** (< 2500 words) An hypothesis article should describe a novel hypothesis/phenomenon (or) an improvement to an existing hypothesis (or) a better understanding of an existing phenomenon using data points derived from extensive analysis (using prediction and simulation models) of biological data. [abstract < 250 words; background < 750 words; methodology < 500 words; discussion < 750 words; conclusion < 250 words; references - maximum 20]
- **Current trends** (< 1500 words) A short description of current trends in biological knowledge discovery. [abstract < 250 words; background & description < 1250 words; references - maximum 10]
- **Views and challenges** (< 1000 words) A short description of new challenges in biological knowledge discovery and bioinformatics technologies. [abstract < 200 words; background & description < 800 words; references - maximum 10]
- **Prediction models** (< 2000 words) A prediction article should describe a novel model (or) an improvement to an existing model (or) a better understanding of an existing model for biological processes. [abstract < 250 words; background < 750 words; methodology < 500 words; discussion < 750 words; conclusion < 250 words; references - maximum 15]
- **Web database** (< 1000 words) A web database should describe an online database (freely made available) containing a biologically important dataset with a flexible search engine or front end. [abstract < 200 words; description (background, methodology of development, utility to the biological community, caveats, future developments) < 800 words; references - maximum 10]
- **Web dataset** (< 1000 words) A web dataset should describe an online dataset (freely made available) containing a biologically important dataset (s) without a flexible search engine or front end. [abstract < 200 words; description (background, methodology of development, utility to the biological community, caveats, future developments) < 800 words; references - maximum 10]
- **Stand-alone software** (< 1000 words) A stand-alone software (freely made available) can be developed in UNIX or WINDOWS platform with a back end prediction model (an already peer reviewed model). [abstract < 200 words; description (background, software input/output, caveat & future development) < 800 words ; References - Maximum 10]

- **Web software/server** (< 1000 words) A web software/server (freely made available) should describe a web server/software with a back-end prediction model (an already peer reviewed model) [abstract < 200 words; description (background, software input, output, caveat & future development) < 800 words ; References - Maximum 10]
- **Bioinformatics programs** (< 1000 words) A bioinformatics program (freely made available) should describe a UNIX Shell script (or) a ANSI C++ script (or) a Perl script for the manipulation of biological data and modeling and simulation of biological processes. [abstract < 200 words; description (background, input, output, caveat & future development) < 800 words ; references - maximum 10]

Preparing illustrations and figures for accepted articles
The following file formats are accepted with high resolution (300 DPI):

- TIFF

Published data
Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Referencing style
Referencing of most relevant journal articles are welcomed (please be highly specific in citing references) and should be numbered as they occur in the running text (ascending order). Referencing of unpublished data, book(s) chapters and conference materials are not allowed.

Authors list in references
The authors list should be strictly be limited to the first author followed by et al., in case of multiple authors (except for references with two authors, where authors name can be separated by &). All active URL should be given in the reference list.

- Kanguane P *et al. Hum Immunol.* 2001 **62**:539 [PMID:11334679].
- Sakharkar MK & Kanguane P, *BMC Bioinformatics* 2004 **5**:67 [PMID:15175116].
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- All URL references should be active.
- URL references are counted as references.
- Please provide PMID for indexed abstracts in PUBMED.
- Move all Hyperlinks to Reference List.
- Please follow the [NLM journal](#) abbreviations for references.

as they occur in the running text (ascending order); Referencing of unpublished data, book(s) chapters and conference materials are not allowed.

Authors list in references
The authors list should be strictly be limited to the first author followed by et al., in case of multiple authors (except for references with two authors, where authors name can be separated by &). All active URL should be given in the reference list.

- Kanguane P *et al. Hum Immunol.* 2001 **62**:539 [PMID:11334679].
- Sakharkar MK & Kanguane P, *BMC Bioinformatics* 2004 **5**:67 [PMID:15175116].
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- All URL references should be active.
- URL references are counted as references.
- Please provide PMID for indexed abstracts in PUBMED.
- Move all Hyperlinks to Reference List.
- Please follow the [NLM journal](#) abbreviations for references.

Suggest Potential Reviewers
To speed up the review process please suggest the names (with contact details, email and fax number are appreciated) for a minimum of 5 potential reviewers while submitting your manuscript (please suggest reviewers who can provide a critical review on the subject of your manuscript and have worked on related subjects).

Select Editor
The authors can select their choice of editor from [editorial](#).

Submissions

Please register online and submit your manuscript at the following site
<https://mc04.manuscriptcentral.com/bioinformation>

Accepted Articles
The manuscript should be submitted to publisher{at}bioinformation.net in its accepted form in Microsoft word format unless otherwise stated. Figures should be in the file formats described earlier.

Copyright © 2005-2018 Biomedical Informatics