UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
DEPARTAMENTO DE FARMACOCIÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA MEDICINAL

Marthina Oliveira de Castro

FEBRES HEMORRÁGICAS SUL-AMERICANAS: TRIAGEM DE CANDIDATOS A ANTIVIRAIS PARA INFECÇÕES EMERGENTES

Porto Alegre
2022

Marthina Oliveira de Castro

FEBRES HEMORRÁGICAS SUL-AMERICANAS: TRIAGEM DE CANDIDATOS A ANTIVIRAIS PARA INFECÇÕES EMERGENTES

Trabalho de Conclusão de Curso do Departamento de Farmacociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre a ser avaliado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ligabue Braun

Coorientadora: Profª. Drª. Viviane Rodrigues Botelho

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

de Castro, Marthina

Febres hemorrágicas sul-americanas: triagem de candidatos a antivirais para infecções emergentes / Marthina de Castro. -- 2022.
65f.
Orientador: Dr. Rodrigo Ligabue Braun
Coorientadora: Dra. Viviane Rodrigues Botelho

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Bacharelado em Química Medicinal, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. arenavírus. 2. *Mammarenavirus*. 3. febres hemorrágicas sul-americanas. 4. testes *in sílico*. I. Ligabue Braun, Rodrigo, orient. II. Rodrigues Botelho, Viviane, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA MEDICINAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marthina Oliveira de Castro

FEBRES HEMORRÁGICAS SUL-AMERICANAS: DESENHO RACIONAL DE ANTIVIRAIS PARA INFECÇÕES EMERGENTES

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química Medicinal, pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Aprovado em 10 de fevereiro de 2022.

Banca Examinadora

_____
Prof. Dr. Rodrigo Ligabue Braun, UFCSPA.

_____
Prof. Dr. Tiago Espinosa de Oliveira, UFCSPA.

_____
Dr. Augusto Frantz Uberti, PUCRS.

AGRADECIMENTOS

À minha irmã, que durante toda a minha existência me viu e me fez crescer, nunca poupando esforços em me ajudar e me orientar para que eu me tornasse a pessoa que eu sou hoje. Sophi, tu és a pessoa mais importante na minha vida, e quem eu tenho como inspiração. Obrigada por me aturar desde a infância com brigas que viravam corridas até o banheiro, com noites viradas jogando The Sims, Maple Story e Club Penguin, com lutas pelo controle remoto e com muitos "Nana, me dá um chêro?". Sem o teu apoio, ajuda e cobrança esse trabalho não seria o mesmo. Amanaamaanãna.

Ao meu avô Dodô que é meu maior alicerce e exemplo de superação diária. Vô, tu não só me incentivou a entrar no curso, como me ajudou a permanecer nele até o fim. Tu é a base da minha educação e por quem eu tenho maior admiração.

Ao meu pai que, durante o tempo de faculdade, me ligava para acordar, levava café da manhã e me dava carona; tu tornou esses anos menos doloridos, sempre me ajudando mais do que tu podia. Agradeço pelo amor incondicional demonstrado através de bolos, vídeos fofinhos de gatinhos e cobranças para eu dar o meu melhor. Graças a ti, esse trabalho foi doce como laranja e cenoura com chocolate.

À Bia, minha segunda mãe e anjo da guarda, protagonista das minhas melhores memórias de infância com: o cheiro e o gosto da melhor comida do mundo, os comentários e a parceria de novelas, a irritação em me ver brigar com a Sophi, a devoção, o amor pelos filhos e a imagem de te ver sentada de pernas cruzadas na poltrona da sala olhando pela janela o movimento dos carros. Obrigada pelo maior amor que eu já senti.

À minha mãe que, embora não estivesse presente fisicamente, sempre ajudou da maneira que pôde, e me fez companhia com o verde da Inverno e com os sorrisos nas fotos da minha parede.

À minha vó Xica, meu maior exemplo de feminismo, que sempre me incentivou a ser independente, viajar o máximo o possível e aproveitar a vida.

Aos meus avós Perci e Luiza, vocês me possibilitaram todas essas oportunidades e, por isso, serei eternamente grata.

À minha dinda Jacque e ao meu dindo Manoel, por estarem presentes no momento mais crítico do trabalho e sempre se prontificarem a me ajudar.

Ao Marcos, meu amorzinho, que me acompanhou desde a quarta série e sempre será dono dos momentos mais afetuosos da minha vida.

Às minhas melhores amigas Valentina Barata, Victória Gralha, Júlia Adams e Sara Roxo, por todas as conquistas comemoradas juntas.

À Larissa Helena, dona dos meus planos futuros e da saudade mais intensa, pela irmandade e companheirismo das melhores memórias da minha vida.

À minha irmã de peito Sara Ober e aos meus amigos Anna Frölich, Antonio Peruzzo, Eduarda Arndt, Júlia Nogueira, Pedro Leardin, Stefany Jardim, Sthefanie Gloor e Társis Chagas, por serem o motivo da minha formatura e estarem presentes em todos os momentos nos últimos seis anos. Vocês serão eternos no meu coração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Ligabue Braun, pela orientação, confiança e amizade. Agradeço por entender minhas limitações e por valorizar e me mostrar a importância da ciência da Química Medicinal.

Finalmente, à UFCSPA e à UPorto por serem minha segunda casa e me fazerem crescer profissionalmente e pessoalmente.

RESUMO

Atualmente, é relatado que ao menos cinco arenavírus do Novo Mundo (Junín, Machupo, Guanarito, Sabiá e Chapare) causam febre hemorrágica na América do Sul. Todos esses cinco arenavírus são capazes de infectar humanos e possuem o domínio final P[T/S]AP em sua proteína Z. Esse domínio interage com o gene Tsg101 do complexo proteico ESCRT-I humano para realizar o brotamento do vírion pela membrana celular, permitindo a contínua infecção viral nas células do hospedeiro. Dessa forma, impedir que o vírus se reproduza através da inibição dessa interação é um possível alvo a ser explorado para o desenvolvimento de antivirais. Pensando nisso, Lu et al. (2014) realizaram uma triagem virtual para encontrar compostos biologicamente ativos que possam realizar tal feito; com isso, o composto 4816-0013 foi obtido, apresentando bons resultados *in vitro*. No presente trabalho, foram realizados testes e análises *in silico* para o desenho racional de candidatos a antivirais capazes de combater arenavírus causadores de febres hemorrágicas sul-americanas. Por meio de estratégias computacionais de predição, uma biblioteca de selenilindóis análogos ao composto 4816-0013 foi analisada, verificando as moléculas que apresentariam os melhores resultados farmacocinéticos e farmacodinâmicos para serem selecionadas a passar às próximas fases de ensaios computacionais, de síntese e de testes *in vitro*. Com a obtenção das sequências de aminoácidos da proteína Z, foi realizado o alinhamento, a correspondente reconstrução filogenética e a análise evolutiva dos arenavírus do Novo Mundo. A avaliação da biblioteca de análogos passou, ao fim, por testes *in silico*, permitindo a eliminação dos compostos que apresentaram maior toxicidade. Como perspectivas, vislumbra-se a realização da incorporação de dados estruturais em simulações de afinidade entre os compostos e os alvos.

Palavras-chave: arenavírus; *Mammarenavirus*; febres hemorrágicas sul-americanas; testes *in silico*.

ABSTRACT

Currently, at least five arenaviruses from the New World (Junín, Machupo, Guanarito, Sabiá and Chapare) are reported to cause hemorrhagic fever in South America. All five of these arenaviruses are capable of infecting humans and present the final P[T/S]AP domain in its Z protein. This domain interacts with the Tsg101 gene of the human ESCRT-I protein complex to perform the budding of the virion through the cell membrane, allowing the continuous viral infection in the host cells. Therefore, to prevent reproduction, inhibiting this interaction is a possible target to be explored for the development of antivirals. With that in mind, Lu et al. (2014) performed a virtual screening to find biologically active compounds that can perform such a feat; hence, the compound 4816-0013 was obtained, presenting excellent results in vitro. In this paper, in silico assays and analyses were carried out for the rational design of antiviral candidates capable of combating arenaviruses that cause South American hemorrhagic fevers. Through computational prediction strategies, a library of selenylindoles analogous to compound 4816-0013 was analyzed, verifying the molecules that would present the best pharmacokinetic and pharmacodynamic results to be selected to the next phases of computational essays, synthesis and in vitro tests. After obtaining the amino acid sequences of the Z protein, the alignment, the corresponding phylogenetic reconstruction and the evolutionary analysis of the New World arenaviruses were performed. Finally, the evaluation of the small-molecule library underwent in silico tests, allowing the elimination of the compounds that showed greater toxicity. As future perspectives, the incorporation of structural data will be carried out in docking simulations of affinity between compounds and targets.

Keywords: arenavirus; *Mammarenavirus*; South American hemorrhagic fevers; *in silico* tests.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Administração, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
AIC	Critério de Informação de Akaike
aLRT	Approximate Likelihood-Ratio Test
BHE	Barreira Hematoencefálica
CHAV	Vírus Chapare
CMC	Comprehensive Medicinal Chemistry (banco de dados)
CYP450	Citocromo P 450
Da	Dalton
EC_{50}	Concentração do fármaco para metade do efeito máximo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESCRT	Complexos de classificação endossômica necessários para transporte
FHA	Febre Hemorrágica Argentina
FHB	Febre Hemorrágica Boliviana
FHBr	Febre Hemorrágica Brasileira
FHSA	Febres Hemorrágicas Sul-Americanas
FHV	Febre Hemorrágica Venezuelana
GP-1	Glicoproteína-1
GP-2	Glicoproteína-2
GTOV	Vírus Guanarito
hTfR-1	Receptor humano de Transferrina do tipo 1
IgG Fc	Receptor de imunoglobulina G
JUNV	Vírus Junín
LASV	Vírus Lassa
LCMV	Vírus da Coriomeningite Linfocitária
log P	Coeficiente de Partição de uma Substância em Sistema Octanol/Água
MACV	Vírus Machupo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NM	Novo Mundo
NP	Nucleoproteína
NPS@	Network Protein Sequence @nalysis
P-gp	Glicoproteína-P
PDB	Protein Data Bank

PRABi	Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique
Pre GP-C	Glicoproteína precursora
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ácido Ribonucleico
RNP	Complexo Ribonucleoproteico
SBAV	Vírus Sabiá
SBAV-L	Vírus Sabiá-Like
SMS	Smart Model Selection
SSP	Peptídeo Sinal Estável
Tsg101	Gene de susceptibilidade ao tumor 101
VM	Velho Mundo
VPS	Proteínas de Classificação Vacuolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27

2.1 BROTAMENTO DO VÍRION COMO ALVO FARMACOLÓGICO 28

2.2 SELENILINDÓIS 31

3. OBJETIVOS 35

3.1 OBJETIVO GERAL 35

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 35

4. METODOLOGIA 36

4.1 FILOGENIA DOS ARENAVÍRUS DO NOVO MUNDO 36

4.2 DESENHO RACIONAL DE SELENILINDÓIS 37

4.3 ANÁLISE *in silico*: PROPRIEDADES ADME-T 38

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39

5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA 39

5.2 QUIMIOTECA DE SELENILINDÓIS 45

5.3 SELEÇÃO DE CANDIDATOS: ANÁLISE *in silico* 46

5.3.1 Análise Farmacocinética 46

5.3.2 Análise Farmacodinâmica 53

5.3.2.1 Toxicidade 53

5.3.2.2 Alvos Moleculares 56

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 57

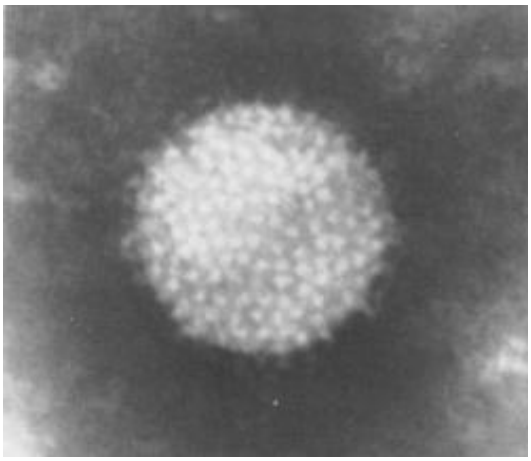
7. REFERÊNCIAS 58

1. INTRODUÇÃO

Membros da família *Arenaviridae* foram primeiramente relatados em 1933, quando Amstrong & Lillie (1934) realizaram uma transmissão intracerebral de material infeccioso entre macacos, obtido da autópsia de um caso resultante da epidemia de encefalite de St. Louis (AMSTRONG; LILLIE, 1934). Com esse estudo, os autores isolaram e realizaram a propagação, em laboratório, de um dos primeiros patógenos do sistema nervoso central humano descobertos, sendo pioneiros no desígnio do primeiro arenavírus encontrado: o vírus da Coriomeningite Linfocitária (LCMV) (MURPHY, 1975).

Com a descoberta dos vírus Junín, em 1958 (PARODI et al., 1958); Tacaribe, em 1963 (DOWNS et al., 1963); Machupo, em 1965 (JOHNSON et al., 1965); Amaparí, em 1966 (PINHEIRO et al., 1966); Tamiami, em 1970 (CALISHER et al., 1970); Lassa, em 1970 (CASALS; BUCKLEY, 1970); Paraná, em 1970 (WEBB et al., 1970); Pichindé, em 1971 (TRAPIDO; SANMARTÍN, 1971), e Latino, em 1970 (mas apenas publicado oficialmente em 1973 (WEBB et al., 1973)), e conclusiva equivalência entre o conjunto de propriedades físico-químicas, sorológicas e morfológicas que todos os vírus apresentaram, eles foram classificados no mesmo grupo. A nomenclatura do grupo foi dada com base na análise morfológica comparativa dos resultados obtidos por microscopia eletrônica associada ao processo de ultramicrotomia, na qual detectou-se a presença de grânulos finos (ribossomos internos) encontrados no vírion, com aspecto arenoso (do Latim *arena*, areia), caracterizando e retratando os “Arenavírus” (Figura 1) (MURPHY et al., 1970; ROWE et al., 1970).

Figura 1 - Imagem obtida por Murphy (1970) da partícula do vírus Tacaribe em contraste negativo do sobrenadante de cultura de células Vero ultracentrifugadas; com aspecto de areia que caracteriza o nome desse grupo de vírus. X 330.000



Fonte: MURPHY et al., 1970

A taxonomia do gênero arenavírus foi inicialmente proposta em 1971, no primeiro relatório do Comitê Internacional de Nomenclatura de Vírus (atual ICTV), cerca de quatro décadas após o descobrimento do LCMV (WILDY, 1971). Logo após, no segundo relatório do ICTV, em 1976, o gênero foi promovido à família *Arenaviridae* para englobar as novas espécies de vírus murídeos com morfologia de aspecto arenoso (FENNER, 1976). Com o descobrimento de arenavírus em serpentes, em 2012 (STENGLEIN et al., 2012), a família que era anteriormente monogenérica, passou a acomodar um segundo novo gênero: o *Reptarenavirus*; consequentemente, o gênero predecessor, *Arenavirus*, passou a se chamar *Mammarenavirus* a partir de 2014 (RADOSHITZKY et al., 2015). Em 2018, a família *Arenaviridae* passou a fazer parte da ordem *Bunyavirales*, estabelecida em 2017 para acomodar vírus relacionados com genomas de RNA segmentados, lineares, de fita simples ambissenso ou de sentido negativo (MAES et al., 2018). Atualmente, a família conta com quatro gêneros (*Anntenavirus*, *Hartmanivirus*, *Mammarenavirus* e *Reptarenavirus*) compostos por 50 espécies, sendo o gênero *Mammarenavirus* o mais numeroso (Tabela 1) (KUHN et al., 2020).

Tabela 1 – Tabela da taxonomia da família *Arenaviridae* da ordem *Bunyavirales*.

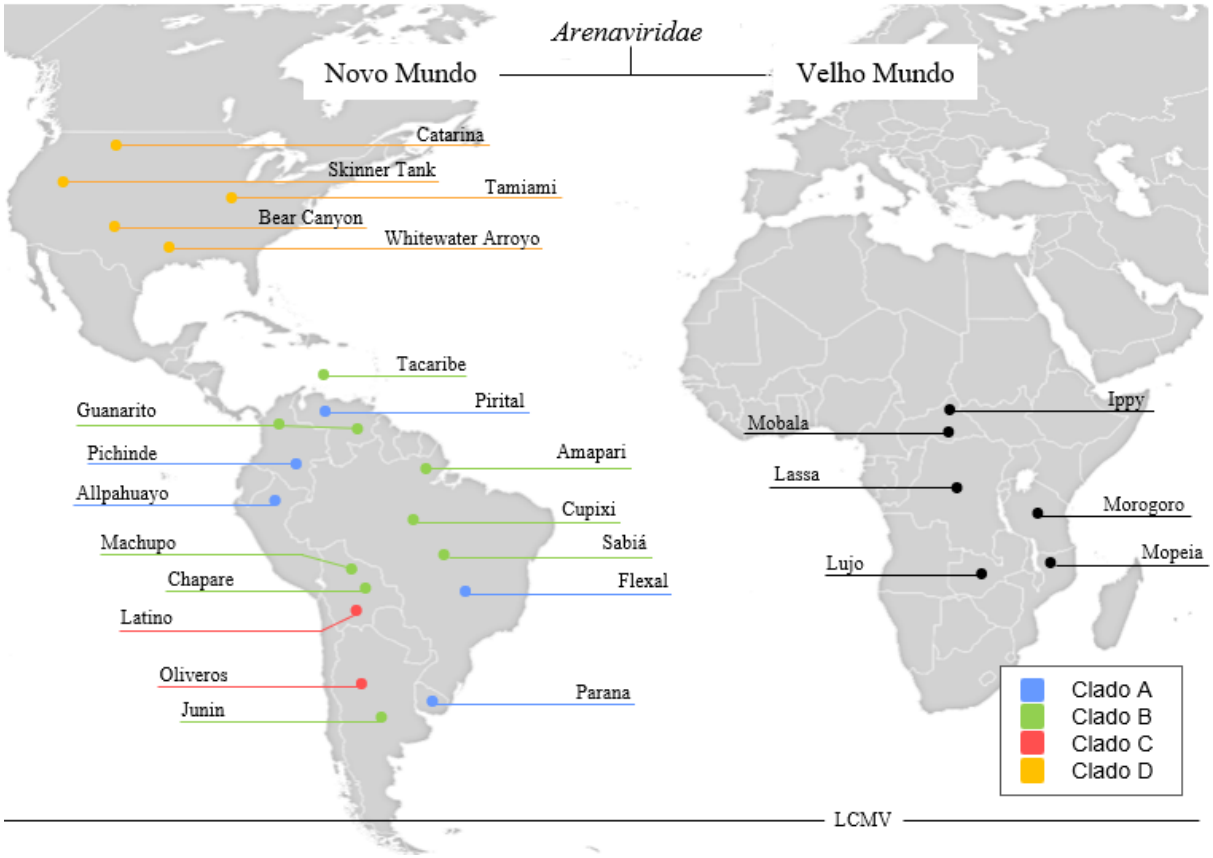
Gênero	**Espécie**	**Vírus (Acrônimo)**
Antennavirus (peixe-sapo)	*Hairy antennavirus*	Wēnlǐng frogfish arenavirus 2 (WlFAV-2)
	Striated antennavirus	Wēnlǐng frogfish arenavirus 1 (WlFAV-1)
Hartmanivirus (serpentes)	*Haartman hartmanivirus*	Haartman Institute snake virus 1 (HISV-1)
	Muikkunen hartmanivirus	Dante Muikkunen virus 1 (DaMV-1)
	Schoolhouse hartmanivirus	Old schoolhouse virus 1 (OScV-1)
		Old schoolhouse virus 2 (OScV-2)
	Zurich hartmanivirus	Veterinary pathology Zurich virus 1 (VPZV-1)
		Veterinary pathology Zurich virus 2 (VPZV-2)
Mammarenavirus (mamíferos)	*Allpahuayo mammarenavirus*	Allpahuayo virus (ALLV)
	Alxa mammarenavirus	Alxa virus (ALXV)
	Argentinian mammarenavirus	Junín virus (JUNV)
	Bear Canyon mammarenavirus	Bear Canyon virus (BCNV)
	Brazilian mammarenavirus	Sabiá virus (SBAV)
	Cali mammarenavirus	Pichindé virus (PICHV)
	Chapare mammarenavirus	Chapare virus (CHAPV)
	Chevrier mammarenavirus	Lìjiāng virus (LIJV)
	Cupixi mammarenavirus	Cupixi virus (CUPXV)
	Flexal mammarenavirus	Flexal virus (FLEV)
	Gairo mammarenavirus	Gairo virus (GAIV)
	Guanarito mammarenavirus	Guanarito virus (GTOV)

	Ippy mammarenavirus	Ippy virus (IPPYV)
	Lassa mammarenavirus	Lassa virus (LASV)
	Latino mammarenavirus	Latino virus (LATV)
	Loei River mammarenavirus	Loei River virus (LORV)
	Lujo mammarenavirus	Lujo virus (LUJV)
	Luna mammarenavirus	Luli virus (LULV)
		Luna virus (LUAV)
	Lunk mammarenavirus	Lunk virus (LNKV)
	Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus	Dandenong virus (DANV)
		Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)
	Machupo mammarenavirus	Machupo virus (MACV)
	Mariental mammarenavirus	Mariental virus (MRLV)
	Merino Walk mammarenavirus	Merino Walk virus (MRWV)
	Mobala mammarenavirus	Mobala virus (MOBV)
	Mopeia mammarenavirus	Mopeia virus (MPOV)
		Morogoro virus (MORV)
	Okahandja mammarenavirus	Okahandja virus (OKAV)
	Oliveros mammarenavirus	Oliveros virus (OLVV)
	Paraguayan mammarenavirus	Paraná virus (PRAV)
	Planalto mammarenavirus	Aporé virus (APOV)
	Pirital mammarenavirus	Pirital virus (PIRV)
	Ryukyu mammarenavirus	Ryukyu virus (RYKV)
	Serra do Navio mammarenavirus	Amaparí virus (AMAV)
	Solwezi mammarenavirus	Solwezi virus (SOLV)
	Souris mammarenavirus	Souris virus (SOUV)
	Tacaribe mammarenavirus	Tacaribe virus (TCRV)
	Tamiami mammarenavirus	Tamiami virus (TMMV)
	Wenzhou mammarenavirus	Wēnzhōu virus (WENV)
	Whitewater Arroyo mammarenavirus	Big Brushy Tank virus (BBRTV)
		Catarina virus (CTNV)
		Skinner Tank virus (SKTV)
		Tonto Creek virus (TTCV)
		Whitewater Arroyo virus (WWAV
	Xapuri mammarenavirus	Xapuri virus (XAPV)
Reptarenavirus (serpentes)	*California reptarenavirus*	CAS virus (CASV)
	Giessen reptarenavirus	University of Giessen virus 1 (UGV-1)
		University of Giessen virus 2 (UGV-2)
		University of Giessen virus 3 (UGV-3)
	Golden reptarenavirus	Golden Gate virus (GOGV)
	Ordinary reptarenavirus	Tavallinen suomalainen mies virus 2(TSMV-2)
	Rotterdam reptarenavirus	ROUT virus (ROUTV)
		University of Helsinki virus 1 (UHV-1)

Fonte: KUHN et al., 2020.

Além da classificação taxonômica, foi criada também uma classificação para distinguir os vírus do sorocomplexo Tacaribe dos vírus do sorocomplexo LCM-Lassa; ou seja, para diferenciar dois grupos de *Mammarenavirus* com base em características antigênicas e genômicas, além de aspectos filogenéticos e geográficos (MOOLLA; WEYER, 2019; TRAUB, 1973). Dessa forma, o gênero *Mammarenavirus* é subdividido em Velho Mundo (VM), no qual se encontram vírus localizados majoritariamente na África, como os vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV), Lassa (LASV), Lujo (LUJV), Ippy (IPPYV), Mopeia (MOPV) e Mobala (MOBV) (MOOLLA; WEYER, 2019); e em Novo Mundo (NM), no qual se encontram vírus descobertos nas Américas, e que, por sua vez, são divididos filogeneticamente nos clados A, B, C e D (Figura 2); sendo que os cinco arenavírus do NM que causam Febres Hemorrágicas na América, encontram-se no clado B, são eles: Junín (JUNV), Guanarito (GTOV), Sabiá (SBAV), Machupo (MACV) e Chapare (CHAV), e um novo vírus Sabiá-Like (SBAV-L), recentemente identificado no Brasil (FERRERO et al., 2021).

Figura 2 - Distribuição dos arenavírus do Novo Mundo e do Velho Mundo, diferenciando os clados do NM por cores.



Fonte: autoral, baseada em FEHLING; LENNARTZ; STRECKER, 2012.

Tabela 2 - Arenavírus do Novo Mundo.

Clado	Vírus	Acrônimo	Distribuição	Hospedeiro	Febre Hemorrágica
A	Flexal	FLEV	Brasil	*Oryzomys spp.*	Não
	Paraná	PARV	Paraguai	*Oryzomys angouya, Oryzomys buccinatus*	Não
	Pichindé	PICV	Colômbia	*Oryzomys albigularis*	Não
	Allpahuayo	ALLV	Peru	*Oecomys paricola, Oecomys bicolor*	Não
	Pirital	PIRV	Venezuela	*Sigmodon alstoni*	Não
B	Guanarito	GTOV	Venezuela	*Zygodontomys brevicauda, Sigmodon alstoni*	Venezuelana (FHV)
	Amaparí	AMAV	Brasil	*Neacomys guianae, Oryzomys goeldi*	Não
	Cupixi	CPXV	Brasil	*Oryzomys capito*	Não
	Sabiá	SBAV	Brasil	?	Brasileira (FHBr)
	Chapare	CHAP	Bolívia	?	Boliviana (FHB) CHAPV-FH
	Tacaribe	TCRV	Trindade e Tobago	*Artibeus jamaicensis*	Não
	Junín	JUNV	Argentina	*Calomys musculinus*	Argentina (FHA)
	Machupo	MACV	Bolívia	*Calomys callosus, Calomys laucha*	Boliviana (FHB)
C	Latino	LATV	Bolívia	*Calomys callosus*	Não
	Oliveros	OLVV	Argentina	*Bolomys spp., Neocromys benefactus*	Não
D	Whitewater Arroyo	WWAV	EUA	*Neotoma albigula*	Não
	Bear Canyon	BCNV	EUA	*Neotoma macrotis, Peromyscus sp.*	Não
	Tamiami	TAMV	EUA	*Sigmodon alstoni, Sigmodon hispidus*	Não

Fonte: autoral, baseada em CHARREL; DE LAMBALLERIE, 2003, 2010; FRANK et al., 2021.

As Febres Hemorrágicas Sul-Americanas (FHSA) causadas por esses vírus zoonóticos do clado B são caracterizadas por infecções não patogênicas em seus hospedeiros naturais (Tabela 2), acarretando a disseminação do vírus entre roedores através do contato com excretas e secreções infectadas, como fezes, urina e saliva (FRANK et al., 2021). Dessa forma, por estarmos tratando de roedores selvagens como vetores, a infecção em humanos é substancialmente mais prevalente entre trabalhadores do ramo da agricultura, que estão mais expostos ao habitat natural do murídeo, em comparação com o resto da população; destacando que o número de casos em homens é três vezes maior que em mulheres, provavelmente pela diferença quantitativa entre os sexos no trabalho rural (MILLS et al., 1994). Além disso, assim como profissionais que trabalham no campo, pesquisadores que trabalham em laboratório com análise direta de arenavírus têm maior risco de infecção (SEWELL, 1995).

A prevalência das FHSA também está diretamente relacionada à dinâmica das populações dos hospedeiros, sendo a distribuição de cada vírus limitada pela distribuição do hospedeiro correspondente. Outro fator considerado no aumento dos contágios está correlacionado com a sazonalidade, posto que, em áreas endêmicas, há maior exposição dos humanos aos hospedeiros em épocas de cultivo e colheita (CHILDS; PETERS, 1993). Mudanças ecológicas naturais, como tempestades e consequentes inundações, também têm sido relevantes para mudanças no comportamento e dinâmica de população do hospedeiro (CHARREL; DE LAMBALLERIE, 2010).

A forma de transmissão para humanos mais comum é a inalação de aerossóis contendo partículas de urina, fezes e saliva infectadas dos roedores, ou através da exposição de uma porção da epiderme rompida, possibilitando o contato direto com material infectado, como, por exemplo, o contágio por mordida do roedor ou o uso de agulhas não esterilizadas (PETERS, 1991; SARUTE; ROSS, 2017). Além desses meios, apesar de não serem tão comuns, já foram descritas infecções por transmissão domiciliar ou hospitalar pelo contato direto co m o indivíduo contaminado, bem como por transmissão sexual (BRIGGILER et al., 1987; SARUTE; ROSS, 2017).

Após a contaminação, o período de incubação é estimado entre 3 a 21 dias, havendo pequenas diferenças entre os intervalos de incubação correspondentes aos diferentes arenavírus (Tabela 3) (FRANK et al., 2021). Depois desse período, ocorre uma fase prodrômica de até 5 dias, envolvendo febre, mal-estar, mialgia, perda de peso e cefaléia. Os sintomas mais comuns desenvolvidos após essa fase, na segunda semana da doença, são: náuseas, vômitos, dores abdominais, conjuntivite, tontura e sangramento gengival; e é possível ocorrer o agravamento de outros sintomas de manifestações neurológicas, como delírio, ataxia, tremores, hiperreflexia, diminuição do tônus muscular, convulsões e coma; manifestações hemorrágicas, como petéquias na pele, equimoses, hematêmese, melena, hematúria e metrorragia, podendo resultar em falência de órgãos e, por fim, em morte (Tabela 4). Com a piora dos sintomas, essa terceira fase da doença ocorre em aproximadamente um terço dos pacientes com FHSA. Casos de morte podem ocorrer de 7 a 12 dias após o início dos sintomas, e aqueles que sobrevivem passam pela convalescença, que é a fase de recuperação, e pode durar até quatro meses, sendo caracterizada por fadiga, irritabilidade, perda de memória, tontura e queda de cabelo. Os pacientes que chegam à etapa final geralmente se recuperam sem sequelas permanentes (FRANK et al., 2021; VAINRUB; SALAS, 1994).

Tabela 3 - Principais apresentações clínicas de Febres Hemorrágicas Sul-Americanas.

Hemorrhagic Fever	Arenavirus	Geographic distribution	Incubation	Early clinical manifestations	Late Clinical manifestations	Mortality
Argentine Hemorrhagic Fever	Junín Virus	Argentina, Buenos Aires, Santa Fe, La Pampa, and Córdoba provinces	6–14 days	Flu-like syndrome. Lack of respiratory symptoms is cardinal	Late Neurological syndrome (LNS)	15%–30% <1% with treatment
Bolivian Hemorrhagic Fever	Machupo Virus	Bolivia, Itenez province	3–16 days	Flu-like syndrome. One-third of cases may progress to progressive neurological and hemorrhagic syndrome	None reported	25%
	Chaparé virus	Bolivia, Cochabamba (small outbreak late 2003, 1 fatality)	3–16 days	Flu-like syndrome Gastrointestinal bleed May progress to ARDS and multiorgan failure.	None reported	60%
Venezuelan Hemorrhagic fever	Guanarito virus	Venezuela, Portuguesa and Barinas state	Up to 19 days	Flu-like syndrome. May present with Upper Respiratory symptoms. May progress to progressive neurological and hemorrhagical syndrome.	None reported	33%
Brazilian Hemorrhagic Fever	Sabiá virus	Brazil, Sao Paulo	6–21 days	Flu-like syndrome, may progress to multiorgan failure	None reported	50%

Fonte: FRANK et al., 2021

Tabela 4 - Sintomas clínicos causados pelas Febres Hemorrágicas Argentina, Venezuelana, Boliviana e Brasileira.

Common clinical features of SAHF	Argentine HF	Venezuelan HF	Bolivian HF	Brazilian HF[e]
Signs and symptoms				
Fever	97%	92.7%	>90%	100%
Malaise	74%	74.5%	[d]	100%
Headache	58%	58.2%	[d]	100%
Myalgia	54% LBP 64%	31%	[d]	100%
Arthralgia	52%	53%	Not reported	Not reported
Oral enanthem	87%	[a]	[a]	[a]
Odynophagia	Not described	36.5% (Tonsillar exudates 13%)	[a]	33%
Cough	Not described	20%	Not described	Not described
Nausea	45%	13%	[d]	100%
Vomiting	34%	34%	[c]	70%
Diarrhea	27%	27%	[b]	[a]
Abdominal Pain	30%	31%	[c]	[a]
Gingival bleeding	12%	53%	[d]	100%
Dehydration	30%	30%	[b]	33% (leading to multiorgan failure)
Hemorrhagic symptoms (GI tract and GU track)	20–30% (2nd week)	-Melena: 20% -Hematemesis: 16.4% -Rectal bleeding: 9%	[b](one-third of patients)	-Metrorrhagia 33% -Hematemesis 33%
Seizures	18% (2nd week and poor prognosis)	18.2%	[b]	33%
Neurological symptoms (confusion, tremors, lethargy, and coma)	- 16% Tremors (tongue and hands) - progressive symptoms (poor prognosis)	Approximately one-third	[b](one-third of patients)	Approximately one-third
Physical exam findings				
Petechial rash	60% (common in axilla, soft palate, and gingival margin in 1st week)	16%	[c]	33% (conjunctival petechiae)
Lymphadenopathies	87% (cervical)	24%	[c]	66% (cervical)
Hepatomegaly	Not common	6%	[a]	
Splenomegaly	Not common	2%	[a]	
Conjunctival congestion/periorbital edema	90.3%	15%	[c]	Not described
Laboratory findings				
Thrombocytopenia <100,000/mm^3	100%	100%	100%	66%
Leukopenia <4000/mm^3	87%	85.7%	100%	66%
Proteinuria >1 g/L	42%	Not described	[c]	33%
Other				
Late Neurological Syndrome	10% of cases treated with Junín virus immune plasma	Not described	Not described	Not described
Mortality	15%–30% (<1% with treatment)	33%	6%–15%	33%

LBP: low back pain.
[a] literature does not specify the presence or frequency of sign/symptom.
[b] described in cases without the specification of frequency of finding.
[c] described as "often" present without the specification of frequency of finding.
[d] described as present in "most cases" without the specification of frequency of finding.
[e] based on 3 cases, 2 were laboratory-acquired.

Fonte: FRANK et al., 2021

Atualmente, a taxa de mortalidade das FHSA é de 15% a 35%, sendo que os principais indicativos de risco para aumento da mortalidade apresentam-se na terceira fase da enfermidade e são eles: o desenvolvimento de características hemorrágicas; o desenvolvimento de sintomas neurológicos; o choque com a falência de múltiplos órgãos; a sepse e superinfecção bacteriana; a trombocitopenia e, por fim, a leucopenia (FRANK et al., 2021). Devido ao quadro clínico extremamente grave da doença, os arenavírus do clado B causadores de febres hemorrágicas requerem nível 4 de biossegurança para manipulação em laboratórios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) e foram classificados como patógenos de categoria A, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos. Nessa categoria são incluídos os patógenos de alta prioridade que representam um risco para a segurança nacional potencialmente causadores de mortes em massa (CDC, 2000). Dessa forma, é estabelecido mundialmente que as FHSA são consideradas de alto risco por provocar doenças fatais e apresentar alta taxa de letalidade.

Até a atual conjuntura, na América do Sul, foram identificadas quatro diferentes Febres Hemorrágicas causadas por cinco arenavírus distintos: a Febre Hemorrágica Argentina (FHA), causada pelo vírus Junín; a Febre Hemorrágica Boliviana (FHB), causada pelos vírus Machupo e Chapare; a Febre Hemorrágica Venezuelana (FHV), causada pelo vírus Guanarito e a Febre Hemorrágica Brasileira (FHBr), causada pelos vírus Sabiá e Sabiá-Like. Nas Américas, a primeira Febre Hemorrágica reconhecida foi a FHA, noticiada no início da década de 1950 na região noroeste da Província de Buenos Aires (PARODI, 1958; RAPP; BUCKLEY, 1962). As FHSA são conhecidas há mais de 70 anos, com casos reportados esporadicamente, sendo o mais recente em janeiro de 2020, com um caso fatal de FHBr, no estado de São Paulo, causado pelo vírus Sábia-Like (DE MELLO MALTA, 2020).

Quantitativamente, a FHA apresentou o maior número de casos quando comparada com as outras FHSA, com aproximadamente dois mil casos apenas na região de Pergamino - uma província de Buenos Aires - entre 1965 e 1974 (MAIZTEGUI, 1975). Até 1998, houve o diagnóstico de 100 a 800 casos por ano relacionados ao vírus Junín na Argentina, e, desde o primeiro relato em 1950 até hoje, a doença totalizou aproximadamente trinta mil casos sintomáticos (CHARREL; DE LAMBALLERIE, 2003; MAIZTEGUI et al., 1998).

A segunda febre hemorrágica que contou com o maior número de infecções foi a boliviana (FHB), da qual mais de mil casos já foram relatados; embora não tenham sido registrados novos casos por um período de 20 anos, entre os anos de 1964 e 1990. (CHARREL; DE LAMBALLERIE, 2003). Após esse período, todavia, foram documentados dezenove casos de infecção pelo vírus Machupo durante a década de 1990; um caso de infecção pelo vírus

Chapare próximo a Cochabamba em 2003 e, mais recentemente em 2019, houve um pequeno surto da doença com cinco infecções causadas pelo vírus Chapare (FRANK, 2021; PROMED, 2020; SARUTE; ROSS, 2017).

Em relação à FHV, foram registrados aproximadamente duzentos casos até hoje, sendo que houve, também, um surto dessa doença, com 18 casos noticiados, em 2002 (CHARREL; DE LAMBALLERIE, 2003). Por fim, no Brasil, houve o relato de apenas quatro casos de FHBr provocados pelo vírus Sabiá, todos no estado de São Paulo: o primeiro caso ocorreu por infecção natural na década de 1990; o segundo por contaminação no laboratório, com amostras relacionadas ao paciente infectado; o terceiro ocorreu em 1999 na cidade de Espírito Santo do Pinhal e, mais recentemente, o quarto caso de FHBr ocorreu em Sorocaba no início de 2020 (CHARREL; DE LAMBALLERIE, 2003; DE MELLO MALTA et al., 2020).

A frequência esporádica de infecção por arenavírus do clado B pode ser explicada, principalmente, pelo fato de que a localização do habitat natural do hospedeiro praticamente limita-se à zona rural. Entretanto, há um crescente número de estudos que indicam o alto grau de plasticidade genética dos *Mammarenavirus*, podendo resultar em uma reemergência da doença caso haja a adaptação a novos hospedeiros em um transbordamento zoonótico (LUKASHEVICH; DE LA TORRE, 2021). Zapata et al. (2013) sugeriu que a mudança de hospedeiro é responsável pela evolução do vírus, e essa troca é provavelmente devido a uma polimerase viral propensa a erros ou devido à recombinação que ocorre com a coinfecção de vários arenavírus diferentes em uma única espécie de murídeo (ZAPATA; SALVATO, 2013). Ainda, o contato dos vetores murinos selvagens com os da cidade já foi evidenciado em grandes centros urbanos do Brasil e da Argentina, sendo esse um cenário que poderia facilitar a transposição de barreiras interespecíficas encontradas pelos vírus (CASTILLO et al., 2003; MASI et al., 2010).

Conforme proposto por Luna (2002), a emergência de doenças infecciosas é definida por multifatores (LUNA, 2002); entretanto, devido às características de formação social, política, econômica e cultural do Brasil, o país reúne as condições necessárias para uma possível reemergência de FHSA. Apesar da relação específica de cada arenavírus com seu hospedeiro roedor, é sabido que uma única mutação específica seria suficiente para alterar o tropismo viral de células murinas para células humanas (SIMULUNDU, 2016), possivelmente sendo tão acessível quanto a alteração do tropismo viral de células de ratos selvagens para ratos urbanos. Além disso, também foi publicado que células já infectadas com vírus Junín não impedem a infecção por outro arenavírus (GAUDIN; KIRCHHAUSEN, 2015).

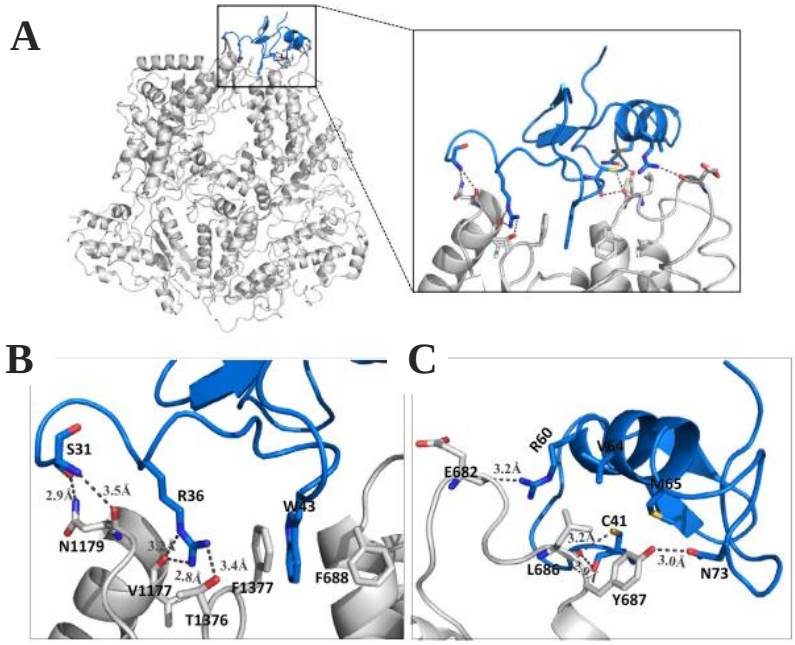
Portanto, levando em consideração o potencial de transmissão de pessoa para pessoa; a alta mortalidade; a possibilidade de mutações que alterem o tropismo viral e a possibilidade de ocorrerem infecções distintas causadas por diferentes arenavírus em apenas um indivíduo, é necessário que, com alguma urgência, sejam avaliados e estudados tratamentos eficazes para FHSA, já que atualmente há uma disponibilidade limitada de terapêuticas e vacinas eficientes.

Até o momento, apenas uma vacina segura e eficaz contra uma febre hemorrágica específica foi desenvolvida: a Candid 1 de JUNV atenuada. Apesar de bons resultados na redução de incidência da doença, a vacina é específica para FHA (MAIZTEGUI et al., 1998). Na literatura também há estudos de reposição de fármacos já aprovados para reaproveitamento no tratamento de FHSA. Segundo Herring (2021), por exemplo, a infecção por arenavírus *in vitro* pode ser inibida com tratamentos em que há a combinação de arbidol com aripiprazol ou sertralina, resultando na supressão sinérgica de pseudovírus contendo glicoproteína de JUNV e LASV (HERRING et al., 2021). Apesar de estudos como esse apresentarem atividade contra arenavírus *in vitro*, sua eficácia e segurança ainda precisam ser determinadas em ensaios *in vivo*. Ainda é muito relatado, também, o uso *off-label* de ribavirina na terapia dessa patologia; a eficácia desse medicamento, entretanto, é apenas parcial, visto que possui uma pequena janela terapêutica e pode provocar efeitos colaterais indesejados (MORENO et al., 2011; PARKER, 2005; WESTOVER et al., 2016). Dessa forma, não existe um antiviral ou uma vacina eficaz contra todas as FHSA que tenha sido aprovado por agências reguladoras. Esse fato pode ser resultado da baixa similaridade de sequência entre as glicoproteínas dos *Mammarenavirus*, dificultando o desenvolvimento de terapêuticas amplamente neutralizantes de direcionamento ao vírus (FERRERO et al., 2021; MAIZTEGUI et al., 1998).

Até então, foram publicados estudos relacionados ao desenvolvimento racional de antivirais focados em mecanismos do ciclo viral. Posto isso, atualmente, há três interações reportadas na literatura que podem ser explorados para a elaboração de compostos biologicamente ativos: a interação entre a proteína Z e a proteína L, duas proteínas do hospedeiro, responsável pela replicação e transcrição de RNA viral; a interação entre a glicoproteína 1 (GP1) arenaviral e o receptor de transferrina 1 humano (hTfR1), responsável pela entrada do vírus na célula; e a interação entre os domínios finais da proteína Z arenaviral e o gene de susceptibilidade ao tumor 101 (Tsg101) do complexo ESCRT-I humano, responsável pelo brotamento do vírion (KANG et al., 2021; RADOSHITZKY et al., 2007; WOLFF; EBIHARA; GROSETH, 2013). Até a atual conjuntura, foram propostos potenciais antiarenavirais apenas para as duas últimas interações, visto que a interação entre a proteína Z e a proteína L ainda é recente e pouco explorada.

A proteína L é regulada pela ligação da proteína Z no local de saída do produto de RNA, desempenhando, assim, um papel crucial nos processos de replicação e transcrição durante o ciclo de vida do vírus. Apesar dessa interação ser unicamente arenaviral (Figura 3), as chances de desenvolver resistência a fármacos são relativamente baixas, posto que as sequências de aminoácidos de L são altamente conservadas, indicando que essa interação é importante para o bom funcionamento viral (DAS; ARNOLD, 2015). Além disso, essas estruturas são conservadas em todas as espécies de vírus, aumentando a possibilidade de desenvolvimento de fármacos de amplo espectro, tornando essa interação promissora para estudos de planejamento racional de fármacos (KANG et al., 2021).

Figura 3 – A) Representação em *cartoon* da estrutura JUNV L (cinza) – Z (azul), com destaque das interações do complexo. B,C) Detalhes das interações moleculares entre as proteínas JUNV L e Z, com indicação dos resíduos envolvidos.

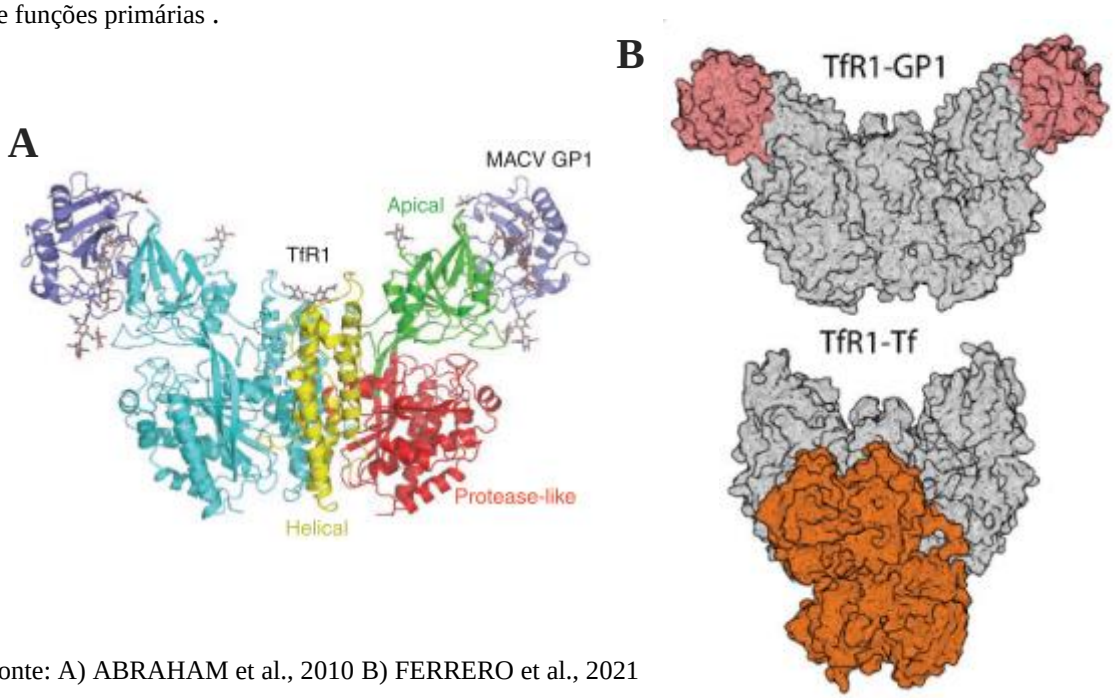


Fonte: KANG et al., 2021.

O segundo mecanismo estudado para esse fim é a entrada viral na célula. Assim, apesar da baixa identidade (25 a 46%) entre as sequências de glicoproteínas dos arenavírus do clado B, todos compartilham do mesmo receptor humano para entrada celular: o receptor de transferrina humana 1 (hTfR-1), uma proteína transmembrana de passagem única que regula a absorção de ferro pelas células e que possui um domínio apical onde há interação com a GP1 dos arenavírus (Figura 4) (RADOSHITZKY, 2007). O receptor TfRh-1 é amplamente expresso em diversos tipos celulares, como linfócitos ou células da mucosa; assim, a capacidade de infectar células usando este receptor de superfície celular leva a alterações em vários sistemas

de órgãos (BELL, 2016). Dessa forma, a interação ao mesmo epítopo em hTfR-1 que todos os membros do clado compartilham (Tabela 5) torna esse alvo molecular atraente para o desenvolvimento de inibidores de amplo espectro para entrada viral, visto que agentes antivirais diretos, focados apenas no arenavírus, são considerados pouco eficazes por estarem sujeitos aos efeitos negativos de recorrentes mutações virais quanto à resistência à molécula ou mudanças de interação com o fármaco.

Figura 4 – A) Representação em *cartoon* do complexo hTfR-1 e GP1 de arenavírus, indicando os domínios presentes no receptor e a interação entre a GP1 e o domínio apical. B) Representação em superfície molecular da diferença entre o sítio de interação do hTfR-1 com a GP1(rosa) e a transferrina(laranja), indicando a não alteração de funções primárias .



Fonte: A) ABRAHAM et al., 2010 B) FERRERO et al., 2021

Tabela 5 – Receptores identificados pelos diferentes arenavírus causadores de FHSA do clado B.

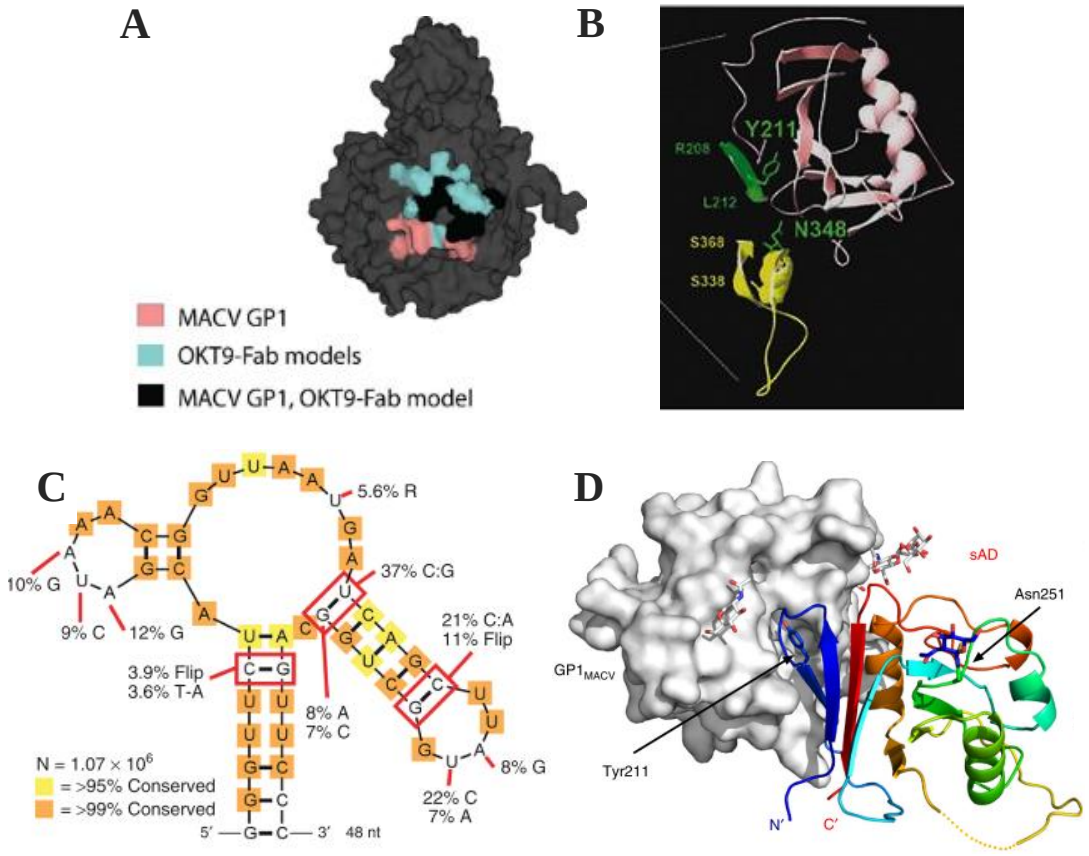
	CcTfR1	CmTfR1	AjTfR1	ZbTfR1	NsTfR1	hTfR1
MACV	X		X	X	X	X
JUNV	X	X	X	X	X	X
TCRV			X	X	X	
GTOV				X	X	X
AMAV				X	X	
SBAV	-	-	-	-	-	X

Fonte: ABRAHAM et al., 2010

Apesar de um alvo bastante atraente, ainda não foram desenvolvidas e estudadas moléculas pequenas que possam ser facilmente sintetizadas e tenham ação nesse receptor. Na literatura, são relatados poucos estudos que exploram essa interação e apresentam alternativas

com bons resultados *in vitro*: o anticorpo OKT9 murídeo, de inibição competitiva por bloqueio estérico da entrada celular (Figura 5A) (FERRERO et al., 2021); o anticorpo monoclonal ch128.1, que inibiu eficientemente a entrada mediada pelas glicoproteínas de cinco arenavírus, bem como a replicação do vírus Junín infeccioso (Figura 5B) (HELGUERA et al., 2012); o aptâmero Waz capaz de se coordenar ao domínio apical do receptor e inibir a infecção viral (Figura 5C) (MAIER et al., 2016) e a proteína recombinante Arenacept, que consiste na fusão de uma sequência de aminoácidos de um domínio apical de hTfR-1 e uma sequência de aminoácidos de IgG Fc (Figura 5D) (COHEN-DVASHI et al., 2020).

Figura 5 – A) Interação entre o domínio apical da hTfR1 (cinza) e o anticorpo OKT9 (preto). B) Representação em *cartoon* do complexo MACV GP1 (PDB ID: 3KAS) com os resíduos S338 a S368 do sítio de ligação putativo ch128.1 (amarelo), sendo que N348 faz parte dos sítios de ligação ch128.1 e MACV GP1. C) Indicação dos 48 nucleotídeos do núcleo do aptâmero com suas respectivas estatísticas de sequência para seleção de Waz. D) Estrutura de Arenacept (arco-íris: N-terminal (azul) ao C-terminal (vermelho)) complexada com MACV GP1 (branco) e indicação (Tyr211 e Asn251) das interações chave.

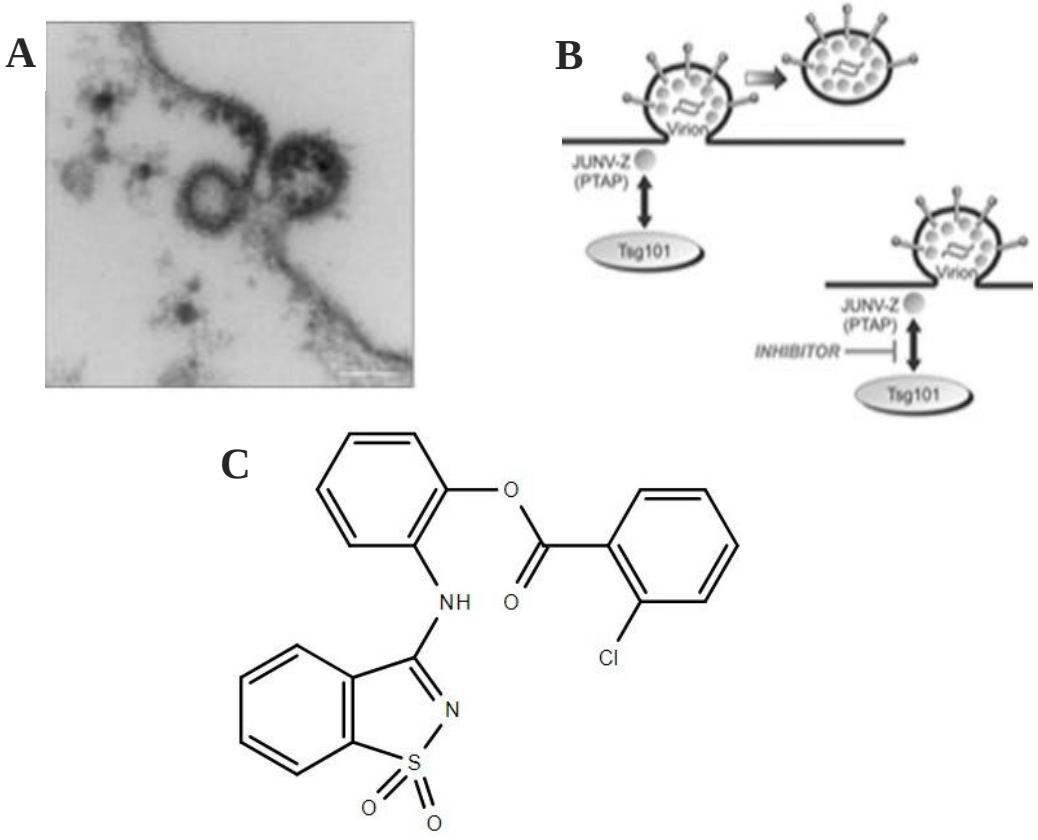


Fonte: A) FERRERO et al., 2021 B) HELGUERA et al., 2012 C) MAIER et al., 2016 D) COHEN-DVASHI et al., 2020.

A interação entre a proteína Z dos vírus e o complexo proteico ESCRT humano constitui o terceiro potencial mecanismo de ação para um antiviral, visto que essa interação é responsável pelo brotamento do vírus (Figura 6A) (URATA; YASUDA, 2012). Para melhor delineamento

dessa alternativa, o uso de diferentes técnicas computacionais para o planejamento de fármacos é indispensável para a economia de tempo e custos de desenvolvimento. Dessa forma, métodos de modelagem, dinâmica e atracamento moleculares são estratégias iniciais para o desenvolvimento de novos antivirais. Pensando nisso, Lu et al. (2014) realizou uma triagem virtual de moléculas pequenas com características farmacóides para identificar possíveis agentes na inibição do domínio P[T/S]AP da proteína Z de JUNV com Tsg101 do complexo ESCRT humano (Figura 6B), apontando um potente inibidor (4816-0013) (Figura 6C) com bons resultados *in vitro* (LU et al., 2014). A inibição dessa interação proteína-proteína, portanto, se mostrou um método promissor no desenvolvimento de antivirais para o tratamento de febres hemorrágicas distintas causadas por arenavírus. Ademais, os estudos comprovaram a eficácia de uma molécula pequena com ótimos resultados preliminares, e que, segundo Lu et al. (2014), estudos futuros incluem usar abordagens de química medicinal para aprimorar tanto a potência quanto as propriedades farmacóides da molécula.

Figura 6 – A) Brotamento de arenavírus da superfície das células infectadas. Imagem obtida por microscopia eletrônica de seções ultrafinas de células Vero infectadas com LASV. Bar, 100nm. B) Esquema do mecanismo de inibição da interação para brotamento do vírus. C) Composto 4816-0013 ($C_{20}H_{13}ClN_2O_4S$).



Fonte: A) FEHLING et al., 2012. B, C) LU et al., 2014.

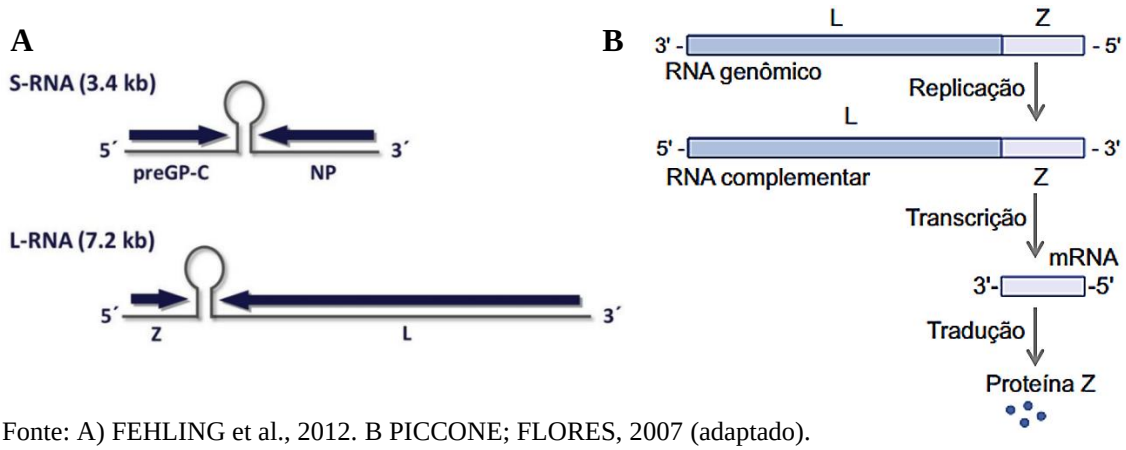
Analisando a conjuntura brasileira em que estamos inseridos; a falta de antivirais específicos para tratamento de febres hemorrágicas na América do Sul e a potencial urgência de criação de terapêuticas eficientes e eficazes contra essas moléstias, este trabalho propõe estudos computacionais iniciais com uma biblioteca de compostos selenilindóis baseada no protótipo 4816-0013 obtido por Lu et al. (2014). Esses estudos analisarão a atividade dessas moléculas e, consequente viabilidade no emprego de antivirais capazes de combater arenavírus através do bloqueio da interação Proteína Z P[T/S]AP-Tsg101 (KIM; VENTURINI; DE LA TORRE, 2021; LU et al., 2014). Todos os candidatos identificados serão avaliados *in silico* quanto ao seu perfil farmacocinético e potencial toxicidade para analisarmos a capacidade *druglikeness* dessas moléculas propostas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os vírions dos arenavirus são esféricos ou pleomórficos; variam em diâmetro de 50 a 300 nanômetros e são estruturalmente organizados em um envelope lipídico contendo um genoma de RNA bissegmentado de fita negativa (Figura 7A) (WOLFF; EBIHARA; GROSETH, 2013). Cada um dos segmentos codifica duas proteínas virais em uma orientação ambissenso – que é a codificação no sentido do RNA genômico em sentido positivo, e do RNA complementar em sentido negativo (PICCONE; FLORES, 2007). Dessa forma, o segmento pequeno de RNA (RNA-S) codifica a nucleoproteína (NP) e a glicoproteína precursora (preGP-C); e o segmento grande de RNA (RNA-L) codifica a RNA polimerase L e o domínio RING da proteína Z (FEHLING; LENNARTZ; STRECKER, 2012).

No RNA-L, o gene Z possui polaridade positiva, o que significa que a região de molde para a síntese de proteína está presente no RNA genômico. Porém, nesse caso, este gene não é expresso pela tradução direta do genoma; dessa forma, ocorre primeiro a síntese do RNA complementar, a partir do qual o RNA mensageiro (mRNA) é transcrito para, por fim, haver a tradução do mRNA e consequente síntese da proteína Z (Figura 7B) (PICCONE; FLORES, 2007). Embora essa proteína seja a menor proteína arenaviral, ela atua na infecção do patógeno e possui diversas funções vitais para o vírus, como a regulação da síntese de RNA; a interação com proteínas de células hospedeiras; a organização do conjunto viral e o brotamento. O brotamento, por sua vez, é uma fase primordial para a contínua infecção de outras células no hospedeiro, visto que nele há a liberação de partículas infecciosas da membrana plasmática para recomeçar o ciclo arenaviral (FEHLING; LENNARTZ; STRECKER, 2012). Dessa forma, a inibição de ligações específicas que possibilitam esse brotamento pode ser uma excelente via para futuros antivirais e, por isso, será explorada a seguir.

Figura 7-A) Segmentos S e L do RNA viral. B) Esquema da expressão genômica do gene Z do RNA-L.

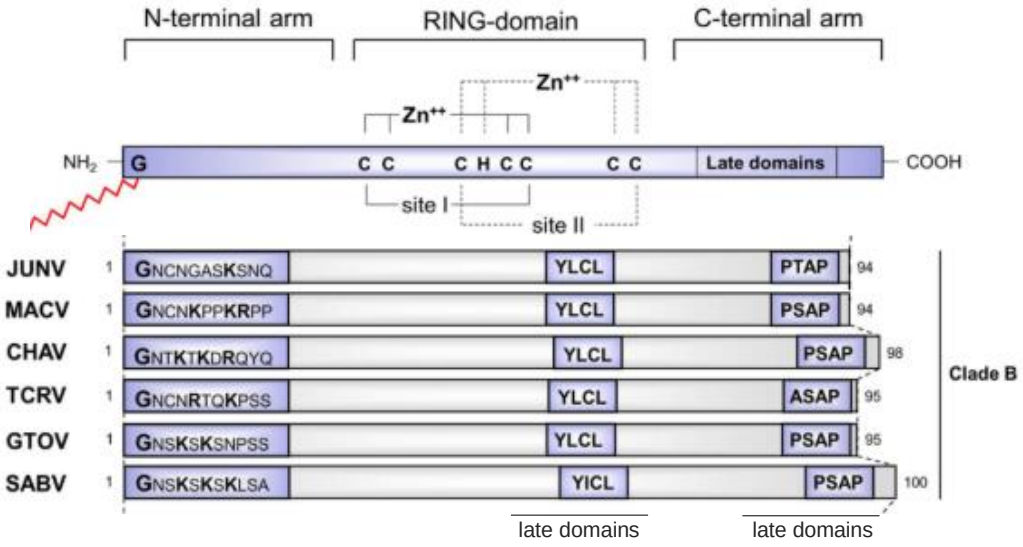


Fonte: A) FEHLING et al., 2012. B PICCONE; FLORES, 2007 (adaptado).

2.1 BROTAMENTO DO VÍRION COMO ALVO FARMACOLÓGICO

A proteína Z é constituída por três principais segmentos (Figura 8): a porção N-terminal que possibilita o mecanismo de miristoilação – que é a acilação à glicina para ligação do ácido mirístico - a porção do domínio RING conservado, o qual está localizado na região central da proteína e coordena a ligação de dois átomos de zinco; e a porção final, que é constituída pelos últimos domínios abrigados pela parte C-terminal (FEHLING; LENNARTZ; STRECKER, 2012). Esses domínios tardios intermediam o brotamento através das interações entre proteínas virais e complexos de classificação endossômica necessários para transporte (ESCRT), que constituem a via de classificação vacuolar de proteína (VPS) (PEREZ; CRAVEN; DE LA TORRE, 2003).

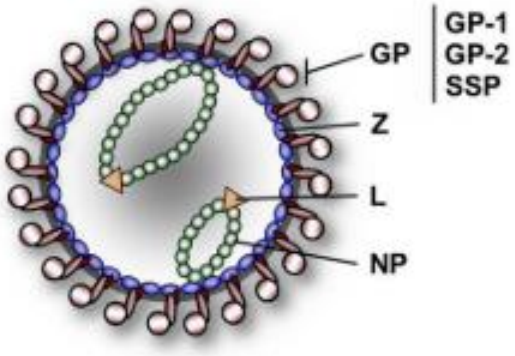
Figura 8 – Segmentos estruturais da proteína Z dos arenavírus. A miristoilação está indicada em vermelho na porção N-terminal.



Fonte: FEHLING et al., 2012.

O vírion dos arenavírus (Figura 9) é composto por uma superfície de glicoproteína viral (GP) constituída por *spikes* de glicoproteína-1 (GP-1), glicoproteína-2 (GP-2) e peptídeo sinal estável (SSP), necessários para ligação com o receptor e para a entrada viral. Internamente, uma camada composta de proteína Z reveste a membrana do vírion, auxiliando na produção de partículas estruturalmente análogas a vírus liberadas de células infectadas por brotamento. Por fim, as NP associadas com a polimerase L se agrupam com o RNA genômico formando juntas o complexo ribonucleoproteico (RNP) (FEHLING; LENNARTZ; STRECKER, 2012; URATA; YASUDA, 2012).

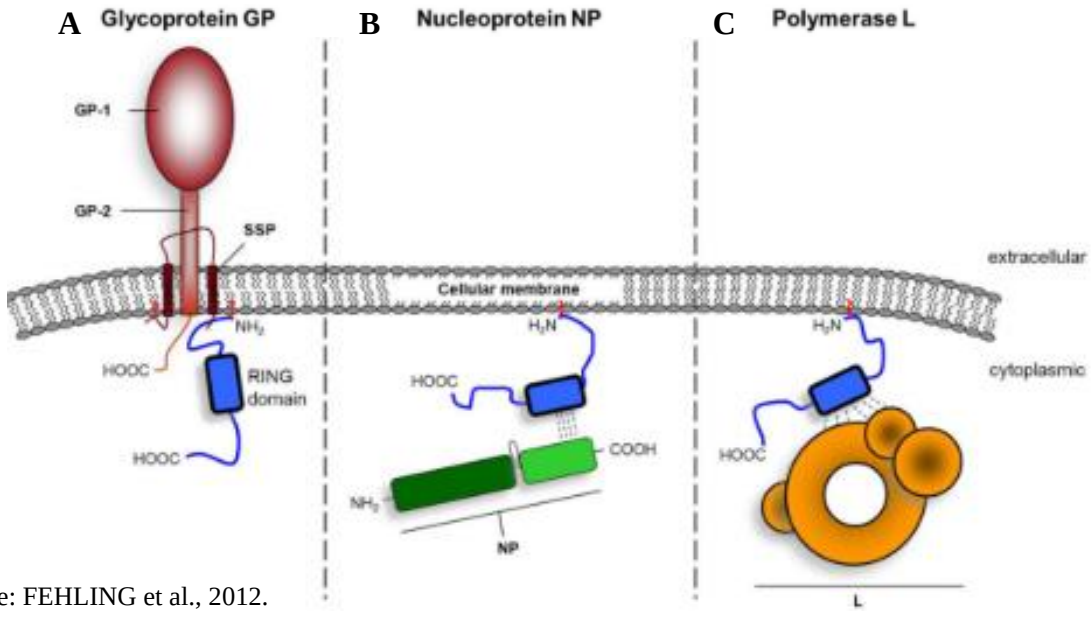
Figura 9 – Organização estrutural do vírion de arenavírus.



Fonte: FEHLING et al., 2012.

Como a proteína Z encontra-se no revestimento interno do vírion, ela coordena diversas ligações adjacentes com as proteínas do vírion que contribuem para a perpetuação do ciclo viral. Dessa forma, a proteína Z interage com a GP, que se localiza na membrana, por meio da porção N-terminal, a qual depende de miristoilação para associar o SSP à porção do domínio RING (Figura 10A). Ainda, há a coordenação direta entre os aminoácidos da porção central do domínio RING da proteína Z com o domínio C-terminal da NP (Figura 10B). Por fim, assim como as NP, a interação entre a polimerase L e a proteína Z também é através dos aminoácidos da porção do domínio RING central (Figura 10C) (FEHLING; LENNARTZ; STRECKER, 2012; KRANZUSCH et al., 2010).

Figura 10 – Interações entre a proteína Z e as proteínas adjacentes localizadas no vírion do arenavírus. A) Glicoproteína viral (GP) composta por GP-1, GP-2 e SSP, o qual realiza a coordenação direta da proteína Z com o conjunto GP. B) Nucleoproteína associada a porção RING da proteína Z. C) Polimerase L ligada à porção RING da proteína Z.

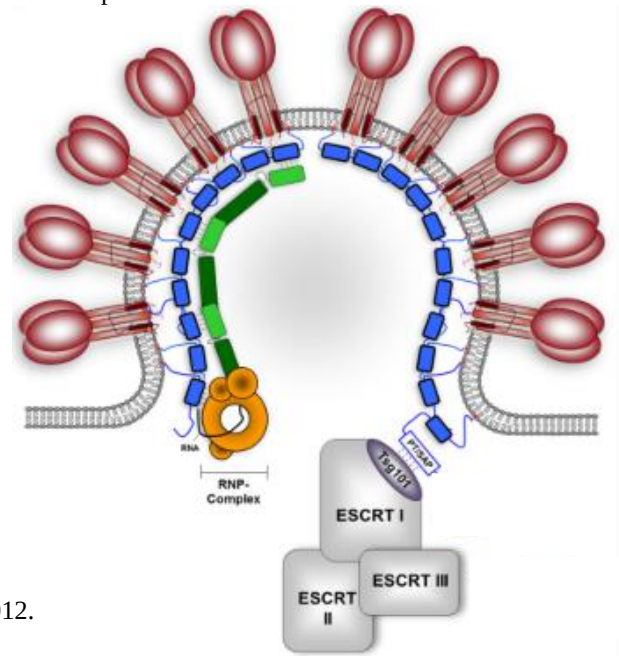


Fonte: FEHLING et al., 2012.

Todas essas interações especificadas são primordiais para a formação e saída do arenavírus da célula hospedeira; ou seja, para o brotamento pela membrana plasmática - e a proteína Z é o regulador chave para esse processo. É através da proteína Z que há o intermédio da montagem do vírion através do empacotamento dos componentes virais e, também, das interações entre proteínas virais e proteínas do hospedeiro necessárias para a liberação do novo vírion por brotamento (FEHLING; LENNARTZ; STRECKER, 2012; URATA et al., 2006).

Primeiramente, para a formação do vírion nascente (Figura 11), há o envolvimento do nucleocapsídeo viral pela membrana lipídica derivada da célula hospedeira. Ainda, são necessárias interações entre a proteína Z e as proteínas GP, NP e L para garantir a incorporação de complexos RNP virais em partículas de brotamento que contêm picos de glicoproteína maduros. Dessa forma, a proteína Z intermedia e fixa a ligação entre essas glicoproteínas, pela interação com o SSP, e o complexo composto por NP, polimerase L e RNA genômico, que é responsável pela infecção contínua de outras células hospedeiras. Após essa incorporação, há a interação dos domínios finais P[T/S]AP da última porção C-terminal da proteína Z do vírus com o gene de susceptibilidade ao tumor 101 (Tsg101) do complexo ESCRT-I humano para, finalmente, haver a cisão da membrana e consequente separação entre o vírion nascente e a membrana da célula hospedeira, o que significa que há a liberação por brotamento do vírion infeccioso da membrana plasmática da célula (FEHLING; LENNARTZ; STRECKER, 2012; URATA; YASUDA, 2012).

Figura 11-Interação da proteína Z (azul) com glicoproteínas (rosa) e com o complexo ribonucleoproteico (RNP), composto por nucleoproteínas (verde) e polimerase L (laranja) associadas ao RNA genômico (preto), incorporando esse complexo viral no vírion nascente para a liberação de vírions infecciosos pela associação dos domínios finais da proteína Z com o Tsg101 do complexo ESCRT-I humano.



Fonte: FEHLING et al., 2012.

Os domínios finais codificados por Z facilitam a interação com Tsg101, um componente dos complexos de classificação endossômica necessários para a maquinaria de transporte (ESCRT), viabilizando o recrutamento da maquinaria VPS para o local de brotamento do vírus (WOLFF; EBIHARA; GROSETH, 2013). Foi justamente nessa interação final que Lu e colaboradores (2014) atuaram para inibição desse ciclo viral. Logo, com base na estrutura de ressonância magnética nuclear conhecida do local de interação Tsg101-P[T/S]AP, foi realizada uma triagem *in silico* para identificação de possíveis inibidores competitivos. Os resultados foram promissores, apontando um composto com maior potência (Figura 6C) que bloqueia a interação entre os domínios tardios da proteína Z dos arenavírus (P[T/S]AP) e o Tsg101 do complexo ESCRT-I humano, diminuindo a progressão da doença em indivíduos infectados e, portanto, atenuando a disseminação do vírus (LU et al., 2014).

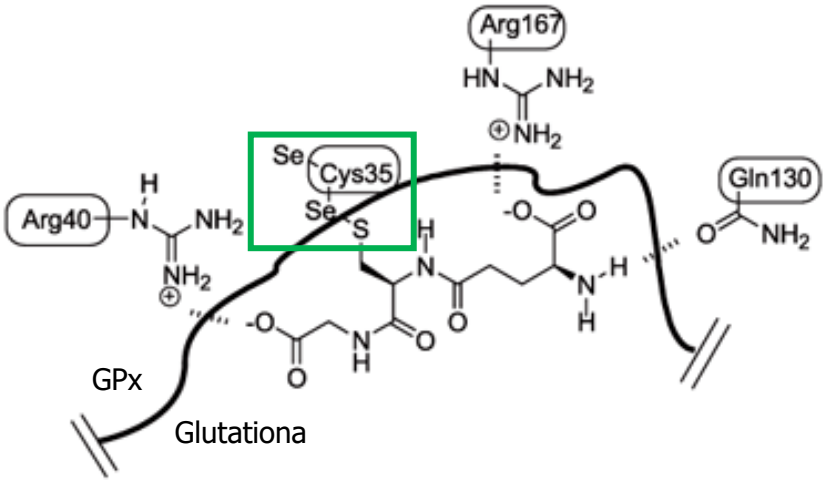
Os estudos de Lu et al. (2014) possibilitaram um direcionamento para um composto promissor que apresenta bons resultados *in vitro* com uma baixa citotoxicidade em cultura celular e com um $EC_{50} < 1$ μM. Além disso, prevê um possível fármaco com um mecanismo de ação direcionado a uma interação vírus-hospedeiros, diminuindo a possibilidade de resistência do medicamento, visto que contorna as mutações virais. Posto isso, utilizando abordagens de química medicinal e procurando aprimorar propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas, incluindo aumento de potência e seletividade do composto base, uma quimioteca de selenilindóis foi estudada para esse fim, indicando, assim, compostos baseados em estruturas racionais para tratar doenças associadas à infecção por arenavírus (LU et al., 2014).

2.2 SELENILINDÓIS

O elemento químico selênio foi descoberto em 1817 pelo químico Jöns Jacob Berzelius e, desde seu descobrimento até a atualidade, o selênio passou de agente considerado altamente tóxico a elemento essencial à saúde humana, dado que participa de processos químicos e biológicos (COMINETTI; COZZOLINO, 2009). Em 1973, Rotruck demonstrou que a Glutationa Peroxidase, uma das enzimas responsáveis pela desintoxicação do organismo no combate às espécies reativas de oxigênio (EROs), é composta por selênio (Figura 12) (ROTRUCK et al., 1973). Após esse estudo, esse calcogênio foi considerado um oligoelemento essencial para o sistema imunológico; com proteção antioxidante e ação contra metais pesados e xenobióticos, além de participar do metabolismo de hormônios da tireoide (COMINETTI;

COZZOLINO, 2009). Outras funções do selênio ainda estudadas incluem as atividades anti-inflamatórias, anticancerígenas e antivirais (RAYMAN, 2000).

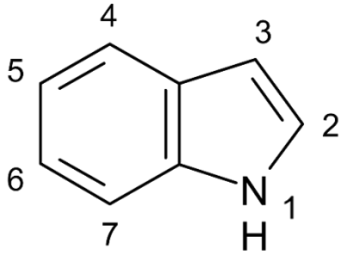
Figura 12 – Representação das interações da glutationa com o sítio ativo da glutationa peroxidase (GPx). A Selenocisteína está indicada em verde.



Fonte: HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008.

Paralelamente, o benzopirrol, também conhecido como indol, é um heterociclo de dois membros, que, assim como o nome indica, consiste em um anel benzênico acoplado a um pirrol (Figura 13). É um composto planar e aromático, sendo que o nitrogênio não se comporta como uma amina simples, visto que possui um par de elétrons não ligante coplanar aos elétrons dos orbitais *p*, que participa da ressonância, e uma ligação com um átomo de hidrogênio, responsável pelo caráter ácido do indol. As moléculas contendo o núcleo indólico são conhecidas por comporem algumas estruturas biológicas de grande importância, como por exemplo o aminoácido L-triptofano e seus derivados, além dos neurotransmissores serotonina e melatonina (FERREIRA, 2014).

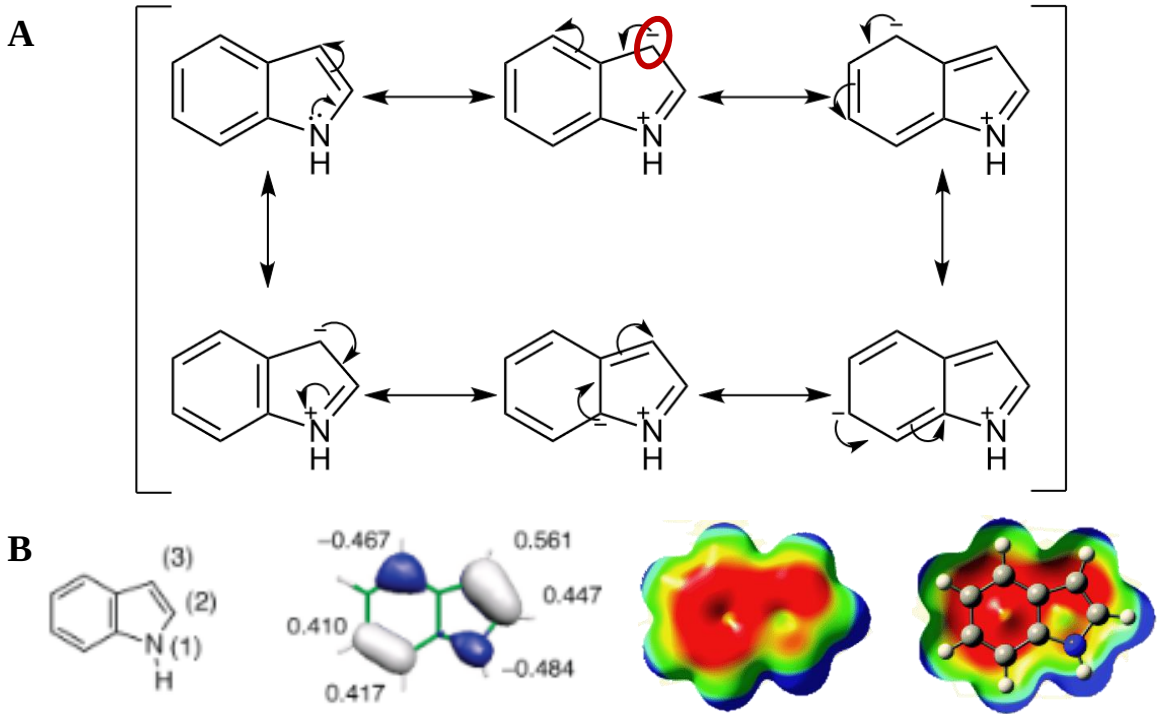
Figura 13 – Estrutura do núcleo indólico.



Fonte: autoral.

Em uma abordagem sintética, o indol pode sofrer reações de substituição eletrofílica, principalmente na posição 3, posto que é mais reativa por possuir densidade negativa, sendo, assim, mais suscetível a ataque eletrofílico (Figura 14A). A reatividade dessa posição tem sido explorada pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos, como no caso da indometacina, um anti-inflamatório não esteroidal (FERREIRA, 2014).

Figura 14 – A) Ressonância do indol: densidade negativa no carbono 3 (indicado em vermelho), sujeito a substituição eletrofílica. B) Valores do coeficiente de reatividade de substituição eletrofílica aromática, comprovando que a posição C3 é mais reativa que C2; demonstrada, também, pelo mapa de densidade eletrônica do indol.



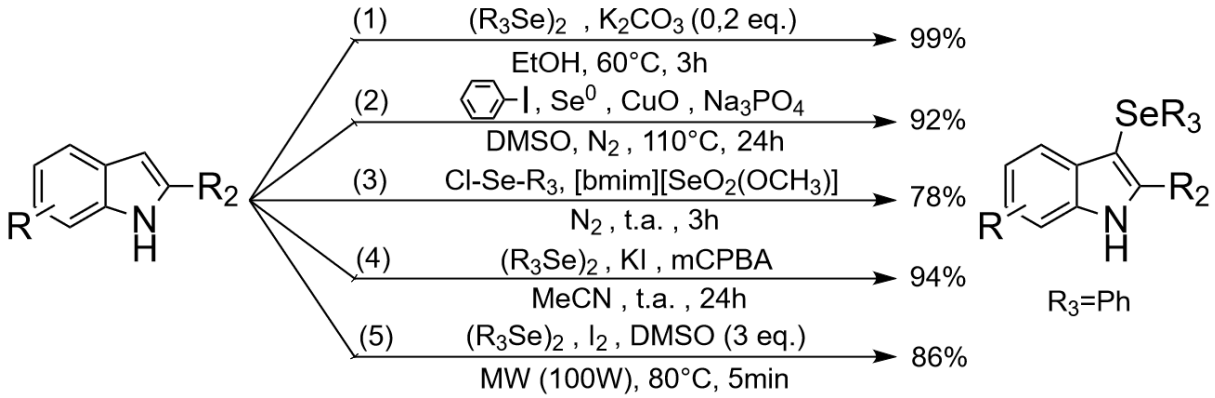
Fonte: A) autoral B) CHROSTOWSKA et al., 2014.

Dada a importância do selênio na regulação do corpo humano, o planejamento racional de fármacos contendo esse elemento é interessante devido a sua multifuncionalidade. Como consequência do atrativo potencial biológico de indóis substituídos, várias metodologias sintéticas foram estudadas e desenvolvidas para a construção de indóis substituídos contendo calcogênio na posição 3 (FERREIRA, 2014).

A incorporação de selênio como substituinte em indóis foi primeiramente publicada por Du (2011) sendo pouco reportada na literatura atualmente (DU et al., 2011). Há cinco principais metodologias sintéticas de selenilindóis que utilizam indóis comerciais ou previamente produzidos como material de partida. Esses protocolos possuem rotas sintéticas versáteis, dado que são capazes de produzir um amplo conjunto de moléculas derivadas com potencial

atividade biológica e com um alto rendimento reacional (Figura 15) (AZEREDO et al., 2014; FERREIRA et al., 2015; LI; WANG; YAN, 2017; LUO et al., 2016; ZIMMERMANN et al., 2013).

Figura 15 – Compilação das metodologias sintéticas para obtenção de selenindois utilizando indóis comercialmente disponíveis como reagentes de partida. Indicando as condições reacionais, escopos e rendimentos descritos no protocolo.



Fonte: autoral, baseada em: (1) FERREIRA et al., 2015 (2) LUO et al., 2016 (3) ZIMMERMANN et al., 2013 (4) LI; WANG; YAN, 2017 (5) AZEREDO et al., 2014.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

A partir de ensaios *in silico*, propor e analisar moléculas com potencial atividade antiviral contra arenavírus causadores de febres hemorrágicas sul-americanas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e identificar a conservação evolutiva e estrutural de sítios de interesse na proteína Z-P[T/S]AP dos diferentes arenavírus hemorrágicos, visando otimizar os candidatos identificados para atuarem contra todas ou múltiplas destas moléstias;
- Propor modificações do protótipo 4816-0013 (LU et al.,2014) e testá-las computacionalmente quanto às propriedades ADME-T (absorção, distribuição, metabolização, excreção, toxicidade), identificando potenciais moléculas candidatas a antivirais;
- Comparar os resultados obtidos nas diferentes plataformas *online* publicamente disponibilizadas para determinar as moléculas com maior potencial a antiarenaviral, com bom perfil farmacocinético e com menor probabilidade de apresentarem toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

4. METODOLOGIA

4.1 FILOGENIA DOS ARENAVÍRUS DO NOVO MUNDO

A filogenia molecular busca inferir a história evolutiva de organismos, genes ou proteínas a partir de sequências de aminoácidos ou nucleotídeos, posto que podem ocorrer mutações ou rearranjos através de processos evolutivos que alteram a sua estrutura ou função. Quando as sequências de aminoácidos são analisadas para compreender a filogenia, são utilizados como referência o número de substituições de posições no alinhamento de sequências para descrever a dinâmica das mudanças em uma linhagem ao longo de várias gerações, para, desse modo, determinar os eventos que levaram ao surgimento de novas proteínas em diferentes linhagens. A elaboração de um modelo evolutivo para os *Mammarenavirus* é uma maneira de descrever os processos que moldam essas alterações nas sequências de aminoácidos ao longo do tempo, resultando em representações gráficas que explicam o contexto evolutivo desses arenavírus (VERLI, 2014).

Posto isso, para a construção das árvores filogenéticas e análise de homologia entre as proteínas arenavirais, foram obtidas as sequências FASTA de aminoácidos de todas as proteínas Z de *Mammarenavirus* disponíveis na plataforma do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) baseada nos dados do *Protein Data Bank* (PDB) (NCBI, [s.d.]). Uma vez escolhidas as estruturas peptídicas, as sequências foram alinhadas com o programa de alinhamento progressivo Clustalw através da plataforma *Network Protein Sequence @nalysis* (NPS@) da *Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique* (PRABi); a qual também gerou a sequência consenso e a porcentagem de identidade – que quantifica a similaridade entre as sequências medidas pela porcentagem de caracteres idênticos entre os segmentos analisados (PRABI, [s.d.]). A identificação das regiões que não sofreram mutações nas sequências foi obtida para análise de conservação das ligações alvo para atuação dos candidatos a fármacos. Além disso, pensando em moléculas de amplo espectro que atuem contra diversos arenavírus, a porcentagem de identidade das sequências obtidas se mostrou necessária.

A partir dos dados moleculares resultantes, para garantir que a reconstrução evolutiva das sequências coletadas seja fidedigna, foi utilizado o método qualitativo da Máxima Verossimilhança para produção de árvores filogenéticas confiáveis. Os métodos qualitativos são métodos mais refinados que envolvem algoritmos que atribuem critérios de otimização para definição dos parâmetros necessários para escolher a melhor filogenia e, dessa forma, explicar as relações evolutivas mais precisamente. Através desses métodos, diversas árvores são

construídas seguindo um critério definido pelo algoritmo utilizado; ou seja, são independentes da escolha do operador; sendo que a árvore resultante - entre todas as árvores possíveis produzidas, com maior probabilidade de explicar o conjunto de sequências do alinhamento - é a árvore mais verossímil (VERLI, 2014).

Com o método supracitado, foi utilizada a plataforma PhyML 3.0 da *Montpellier Bioinformatics Platform* para gerar as árvores filogenéticas desejadas (GUINDON et al., 2010). Os parâmetros mais adequados para o tipo de organismo e sequência que foram disponibilizados na plataforma foram definidos pela escolha automática de modelo *Smart Model Selection* (SMS), utilizando o critério de informação de Akaike (AIC), com o intuito de mensurar a simplicidade e qualidade do modelo estatístico e comparar e selecionar o melhor entre eles (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017; MCELREATH, 2015). Ao fim, os melhores modelos de substituição indicados foram o Flu: um modelo de substituição de aminoácidos específico criado para melhorar a compreensão da evolução dos vírus influenza; e o HIVw: um modelo probabilístico específico de evolução de proteínas para HIV, sendo que "w" (within) indica um modelo baseado em estudos intraresultados (DANG et al., 2010; NICKLE et al., 2007). Além disso, foi indicado distribuição Gamma em todas as árvores obtidas, garantindo a heterogeneidade das taxas evolutivas, e frequência de equilíbrio empírica nas árvores relacionadas ao clado B; ou seja, definiu-se empiricamente o ponto em que não existe mais alteração nas frequências dos alelos (VERLI, 2014).

Para garantir que a amostragem foi suficiente e que a filogenia é confiável, foi utilizado um método rápido, preciso, poderoso e robusto: o *approximate Likelihood-Ratio Test* (aLRT) para ramificações. Esse teste de confiança de taxa de verossimilhança é uma alternativa competitiva ao método de *bootstrap* não paramétrico, verificando a confiabilidade nos clados das filogenias obtidas através da comparação de hipóteses do comprimento das ramificações (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006). Por fim, para obtenção das representações gráficas de alta qualidade das árvores filogenéticas resultantes, foi utilizada a plataforma FigTree v1.4.4 (RAMBAUT, 2018).

4.2 DESENHO RACIONAL DE SELENILINDÓIS

Para o desenvolvimento das novas moléculas, primeiramente, a estrutura do composto 4816-0013 de Lu et. al (2014) foi avaliada. Foi realizada uma análise do mapa farmacofórico com o intuito de buscar modificações estruturais visando maior eficácia e menor toxicidade. Dessa forma, procurou-se utilizar o indól como estrutura privilegiada e, também, grupos

bioisostéricos parciais da molécula já conhecida, os quais possuem similaridade de efeito no sítio ativo, mas, por serem estruturalmente diferentes, podem diminuir a toxicidade e aumentar sua ação biológica. Portanto, as moléculas propostas nesse trabalho mantêm o farmacóforo da molécula base, mas propõem algumas mudanças no esqueleto original, as quais passaram por essa avaliação de modo a garantir que o desenho dos novos compostos melhore propriedades ADME-T, tornando-os mais eficientes.

Logo, o planejamento de análogos indólicos ao protótipo 4816-0013 seguiu estratégias de substituição e adição de grupamentos farmacofóricos, além da incorporação de selênio para gerar análogos selenilindólicos, visto que a incorporação do selênio em moléculas orgânicas implica em melhoria de bioatividade. Todas as moléculas inéditas foram avaliadas previamente segundo a sua acessibilidade sintética, sendo considerada alta ou altíssima em todos os casos.

4.3 ANÁLISE *in silico*: PROPRIEDADES ADME-T

Teste *in silico* ajudam a direcionar a pesquisa de bibliotecas de compostos candidatos a novos fármacos; atuando através da exclusão de móleculas que não apresentam bons resultados de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas preditas. Assim, análises *in silico* são ideais para testes preliminares, posto que possuem rápida obtenção de resultados e baixo custo, otimizando o tempo de pesquisa e evitando gastos desnecessários com outros ensaios biológicos. Dessa forma, a avaliação computacional de aspectos de absorção, distribuição, metabolização e excreção dos compostos planejados foi realizada com as plataformas *online* e gratuitas: admetSAR 2.0 (CHENG et al., 2012; YANG et al., 2019); SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) e pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015), conferindo a relação dessas propriedades com características básicas consideradas importantes para análise – como o tamanho, o número de insaturações, a polaridade da molécula, etc; e também verificam se os novos fármacos se encontram dentro das regras de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997), se permeiam ou não a Barreira Hematoencefálica, se possuem boa solubilidade e se têm potencial inibição de CYPs.

Em relação às propriedades farmacodinâmicas, é essencial avaliar se os fármacos são potencialmente tóxicos, por exemplo através dos testes descritos na plataforma ProTox II (BANERJEE et al., 2018). Por fim, é verificado os alvos dos compostos e se há possível ação *off-target* (alvos não intencionais) das moléculas através da plataforma SwissTarget (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2019), verificando se poderá haver sobreposição de alvos para uma mesma molécula.

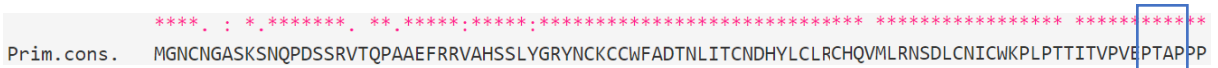
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Como o presente trabalho tem por objetivo estudar os arenavírus sul-americanos e propor compostos que têm como alvo a interação entre a proteína Z viral e o Tsg101 humano, as sequências de aminoácidos obtidas foram relacionadas à proteína Z dos arenavírus do Novo Mundo para identificação de conservação evolutiva e efeitos de mutações. Além disso, deu-se maior destaque às proteínas Z de arenavírus causadores de Febres Hemorrágicas em humanos. Dessa forma, todas as sequências de aminoácidos da proteína Z dos *Mammarenavirus* Junín, Machupo, Guanarito, Chapare e Sabiá foram alinhadas e analisadas, verificando a homologia entre essas espécies (Figura 16).

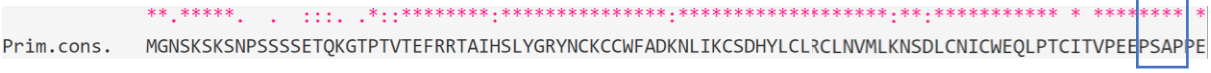
Figura 16 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de proteína Z dos arenavírus causadores de Febres Hemorrágicas sul-americanas. O retângulo indica o sítio considerado essencial para interação de Z com o receptor.

Sequência consenso do arenavírus Junín – identidade de 87,23%

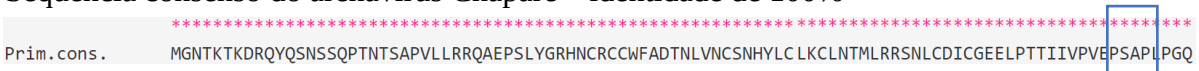


Sequência consenso do arenavírus Machupo – identidade de 86,32%

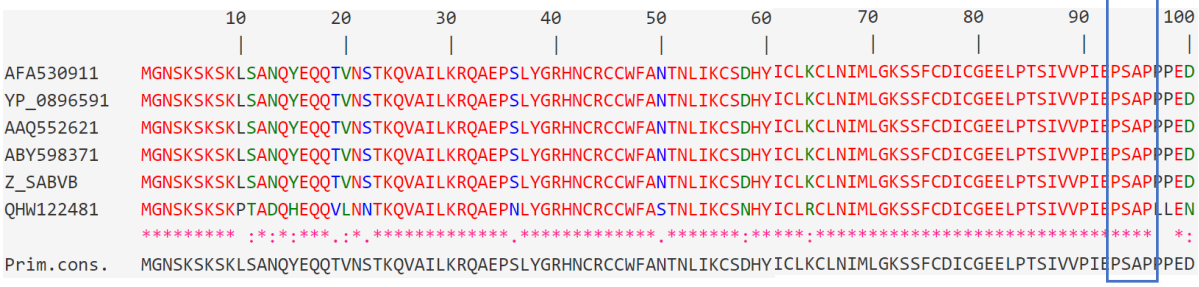
Sequência consenso do arenavírus Guanarito – identidade de 76,84%



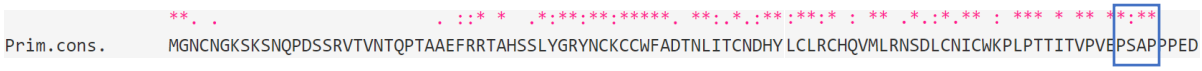
Sequência consenso do arenavírus Chapare – identidade de 100%



Alinhamento e sequência consenso do arenavírus Sabiá – identidade de 86%



Sequência consenso dos arenavírus do clado B que infectam humanos* – identidade de 38%



*Comprimento do alinhamento : 100
Número de sequências analisadas: 83
Identidade (*) : 38.00 %
Forte similaridade (:) : 13.00 %
Fraca similaridade (.) : 10.00 %
Diferentes ( ) : 39.00 %

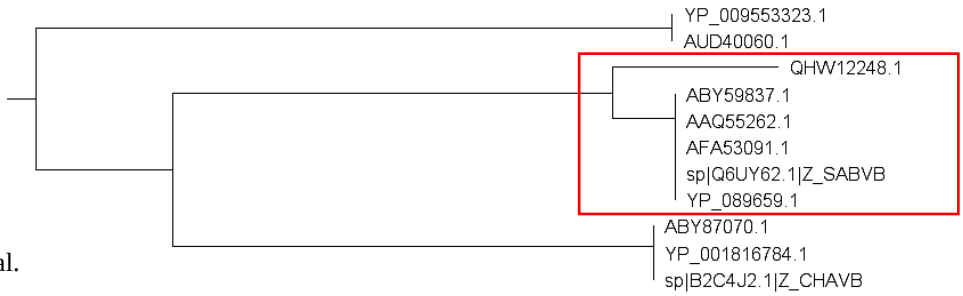
Fonte: autoral.

Com isso, foi possível obter centenas de sequências peptídicas relativas aos arenavírus hemorrágicos na plataforma do NCBI, das quais foram extraídas cerca de oitenta sequências correspondentes à proteína Z. Com o alinhamento resultante, como é possível observar na Figura 16 sinalizada em azul, a porção dos domínios terminais que participam da interação Z P[T/S]AP – Tsg101 são extremamente conservadas, sendo que Junín é o único vírus que possui o aminoácido Treonina ao invés de Serina no domínio final da proteína Z, e ambos aminoácidos podem participar dessa interação essencial para o brotamento do vírion. Caso esse domínio específico não tivesse sido estruturalemente conservado, poder-se-ia prejudicar a capacidade dos compostos de serem ativos contra multialvos; ou seja, possivelmente as moléculas propostas não atuariam contra várias destas hemorragias.

Vírus possuem diversas sequências peptídicas e genômicas que contam a sua história evolutiva; porém, não necessariamente todas as suas proteínas têm a mesma dinâmica de evolução do vírus, visto que ela pode evoluir mais rapidamente, lentamente ou até mesmo não se alterar. Posto isso, com a identificação de conservação evolutiva, é possível intuir que a proteína Z consegue reproduzir adequadamente a história evolutiva do vírus, podendo indicar que essa proteína não só possui um papel indispensável para o ciclo viral, como também pode ser uma das proteínas a ser considerada para delineamento de espécies e classificação dos vírus.

Em 2020, houve um caso fatal de febre hemorrágica brasileira em São Paulo. O vírus que causou essa moléstia foi um *Mammarenavirus* desconhecido até então, mas muito semelhante ao vírus Sabiá, posto que o segmento S tinha 87% de identidade e o L tinha 89% de identidade em um alinhamento completo de nucleotídeos com a cepa SABV SPH114202 (DE MELLO MALTA et al., 2020). Por isso, o arenavírus que desencadeou esse caso foi chamado de Sabiá-Like (Figura 17). Como é possível observar na Figura 16, o alinhamento entre a proteína Z dos arenavírus Sabiá-Like (QHW12248.1) e Sabiá resultou em uma identidade de 86%, indicando que a proteína Z reproduz com certa acurácia a história evolutiva do vírus, posto que para uma divergência evolutiva entre espécies é preciso de pelo menos 12% de diferença entre as sequências proteicas comparadas (ZAPATA; SALVATO, 2013).

Figura 17 – Fragmento da árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança, o retângulo vermelho indica a separação das sequências irmãs de proteína Z dos vírus Sabiá e Sabiá-like.



Fonte: autoral.

É importante destacar, também, que experimentos *in vitro* indicaram que poucas substituições de aminoácidos na proteína L e glicoproteína dos *Mammarenavirus* podem alterar drasticamente o fenótipo viral em relação à persistência e gravidade da doença (PONTREMOLI; FORNI; SIRONI, 2019). Não se sabe se essa condição se aplica à proteína Z, porém é uma hipótese válida, visto que essa proteína possui diversas funções vitais para o vírus e traduz muito bem a sua história evolutiva. É possível intuir, portanto, que mutações adaptativas nas sequências dos *Mammarenavirus* podem acompanhar as mudanças no hospedeiro e, consequentemente, alterar o reservatório do arenavírus (PONTREMOLI; FORNI; SIRONI, 2019); assim, reforçando a importância de estudos no desenvolvimento de antiarenavirais para que seja possível prevenir o aumento de casos da doença.

Com um número relativamente grande de mutações no vírus Sabiá e levando em consideração que a espécie de seu reservatório ainda é desconhecida, é possível que essas mutações tenham ocasionado alterações tanto na manifestação da doença quanto no seu hospedeiro. Essa suposição é baseada na evolução explosiva que vírus possuem e que, desde o descobrimento do LCMV, outras espécies de animais não murídeos foram encontradas carregando arenavírus, como é o caso dos gêneros *Hartmanivirus* (serpentes), *Reptarenavirus* (serpentes) e *Antennavirus* (peixe-sapo). Além disso, Abraham (2010) sugeriu que a capacidade que esses vírus causadores de febres hemorrágicas possuem de se ligar ao hTfR-1 é resultado de uma coevolução, ou seja, esses vírus acidentalmente adquiriram a capacidade de ligar a esse receptor em seus hospedeiros naturais, estando melhor adaptados aos receptores da espécie hospedeira (ABRAHAM et al., 2010), indicando uma grande plasticidade genética que pode alterar o ciclo viral e, consequentemente, a manifestação da doença.

Para análise gráfica e para melhor entendimento da separação e classificação do vírus, os alinhamentos foram empregados em três reconstruções filogenéticas: de todos os clados dos *Mammarenavirus* do Novo Mundo; apenas do clado B arenaviral e, por fim, somente dos arenavírus que infectam humanos causadores de febres hemorrágicas. Dessa forma, utilizando a plataforma PhyML 3.0, foram identificados os melhores modelos e parâmetros para cada uma das árvores filogenéticas produzidas, sendo que houve alterações na escolha do modelo de substituição, no tipo de frequência de equilíbrio e nos valores Gamma escolhidos (Figura 18).

Figura 18 – modelos e parâmetros escolhidos pela plataforma PhyML 3.0 para as árvores filogenéticas dos *Mammarenavirus* do NM obtidas pelo método de Máxima Verossimilhança. A) Modelo de substituição Flu com Gamma estimado de 0,681 obtido para a árvore filogenética de todos os clados dos *Mammarenavirus* do NM. B) Modelo de substituição Flu, com Gamma estimado de 0,469 e frquência empírica para construção da árvore filogenética do clado B dos *Mammarenavirus* do NM. C) Modelo de substituição HIVw com Gamma estimado de 0,441 e frquência empírica para construção da árvore filogenética dos *Mammarenavirus* do clado B que infectam humanos.

A

Best model: Flu +G

Substitution model	: Flu
Equilibrium frequencies	: Model
Proportion of invariable sites	: fixed (0.0)
Number of substitution rate categories	: 4
Gamma shape parameter	: estimated (0.681)

Model	Decoration	K	Llk	AIC
Flu	+G	294	-3162,31959	6912,63918

B

Best model: Flu +G+F

Substitution model	: Flu
Equilibrium frequencies	: Empirical
Proportion of invariable sites	: fixed (0.0)
Number of substitution rate categories	: 4
Gamma shape parameter	: estimated (0.469)

Model	Decoration	K	Llk	AIC
Flu	+G+F	203	-1720,25095	3846,50190

C

Best model: HIVw +G+F

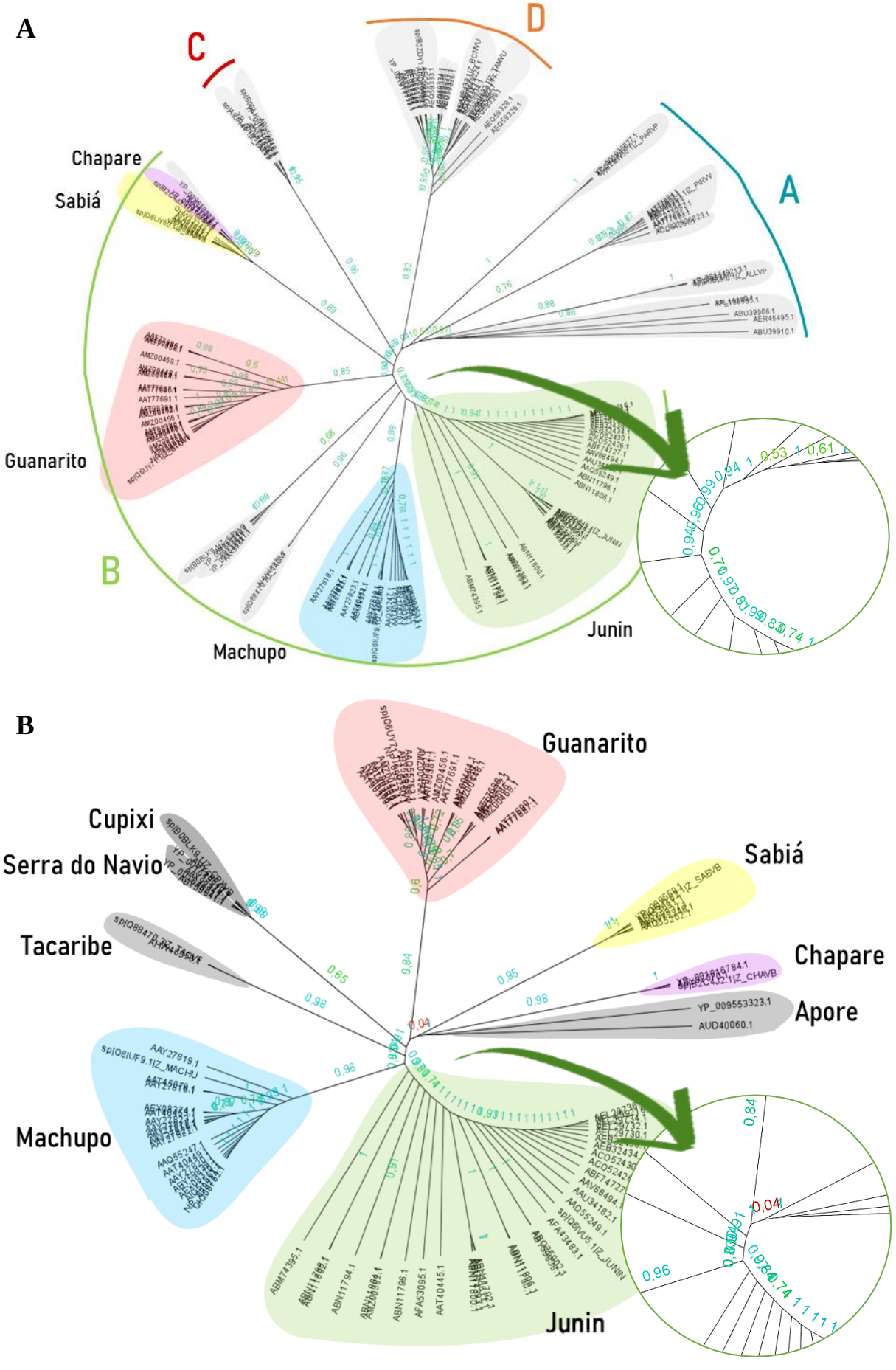
Substitution model	: HIVw
Equilibrium frequencies	: Empirical
Proportion of invariable sites	: fixed (0.0)
Number of substitution rate categories	: 4
Gamma shape parameter	: estimated (0.441)

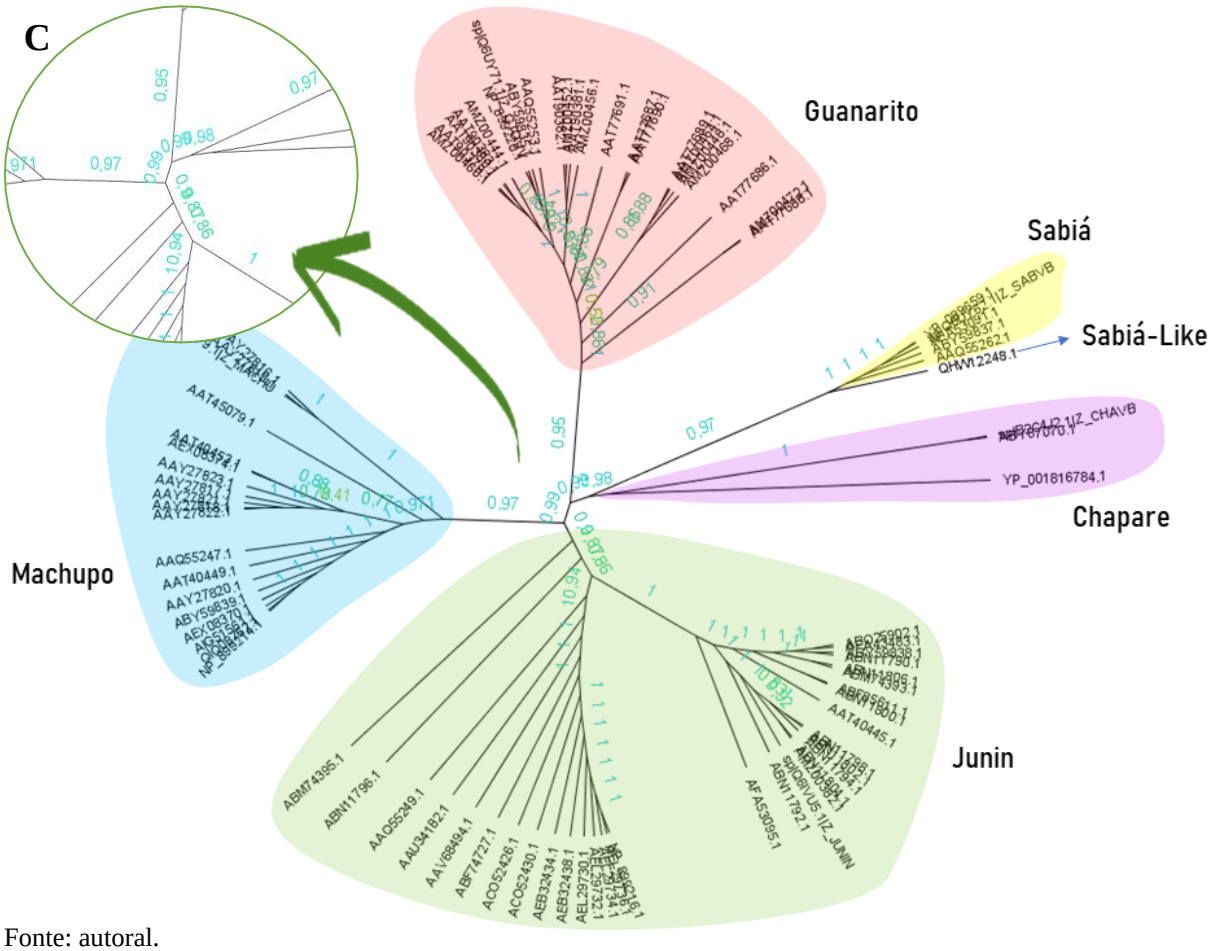
Model	Decoration	K	Llk	AIC
HIVw	+G+F	183	-1266,29213	2898,58426

Fonte: autoral

As três árvores resultantes apresentaram ótimos valores de acurácia para as ramificações internas principais (Figura 19 A, B e C). Dessa forma, é possível observar que o complexo do Novo Mundo é composto por quatro clados diferentes: A, B, C e D, sendo que o clado D já foi anteriormente conhecido e nomeado como clado recombinante A/B (WANG, 2016). Assim, o clado A inclui os cinco arenavírus sul-americanos Pirital, Pichindé, Flexal, Paraná, Allpahuayo. O clado B inclui dez arenavírus sul-americanos, incluindo os vírus Sabiá, Sabiá-Like, Junín, Chapare, Machupo, Guanarito, Amapari, Aporé, Tacaribe e Cupixi. O clado C compreende dois arenavírus sul-americanos: Oliveros e Latino e, por fim, o clado D inclui os sete arenavírus norte-americanos Whitewater Arroyo, Bear Canyon, Tamiami, Skinner Tank, Catarina, Tonto Creek e Big Brushy Tank.

Figura 19 – Árvore filogenética de Mammarenavirus.Sequência de aminoácido de proteína Z foram alinhadas usando ClustalW. A árvore filogenética foi computada usando o método de máxima verossimilhança na plataforma PhyML 3.0. Valores do teste de confiança foram confirmadas por aLRT. A) Árvore filogenética de todos os clados dos *Mammarenavirus* do novo mundo (Flu + G = 0,681). B) Árvore filogenética do clado B dos *Mammarenavirus* do novo mundo (Flu +F+ G = 0,469). C) Árvore filogenética dos *Mammarenavirus* do clado B que infectam humanos (HIVw +F+ G = 0,441). Os códigos do UniProt das proteínas em questão são Q6IVU5 (Junín), Q6UY62 (Sabiá), Q6IUF9 (Machupo), Q6UY71 (Guanarito), 2C4J2 (Chapare), Q88470 (Tacaribe), B0BLK9 (Cupixi), B0BLK8 (Amapari), A0A2U7PKX3 (Apore), B0BLK0 (Allpahuayo), B2MW46 (Flexal), Q915A4 (Pichinde), Q6RSS3 (Pirital), B2MW50 (Paraná), A9JR44 (Latino), B0BLK7 (Oliveros), B2ZDY1 (Whitewater Arroyo), A0PJ23 (Bear Canyon), A9JR22 (Tamiami), G8DZL4 (Skinner Tank), G8DZL2 e G8DZL3 (Catarina), G8DZL8 e G8DZL9 (Tonto Creek), G8DZM0 e G8DZM1 (Big Brushy Tank).


A
C
D
A
Chapare
Sabiá
Guanarito
B
Machupo
Junin
B
Guanarito
Cupixi
Serra do Navio
Sabiá
Tacaribe
Chapare
Apore
Machupo
Junin



Fonte: autoral.

Dessa forma, foi possível observar que as febres hemorrágicas sul-americanas são, de fato, mais similares entre si do que similares a outras febres hemorrágicas causadas por arenavírus em outras áreas geográficas, como pode ser observado na árvore filogenética obtida a partir das sequências dos quatro diferentes clados da Proteína Z arenaviral (Figura 19A). Além disso, é possível notar, com um bom valor de confiança, que todos os vírus responsáveis pelas febres hemorrágicas sul-americanas estão agrupados no clado B (Figura 19B), indicando uma maior conservação evolutiva da sequência nesse clado, que se encontra evolutivamente mais distante dos Clados A, C e D quando comparamos apenas arenavírus do Novo Mundo.

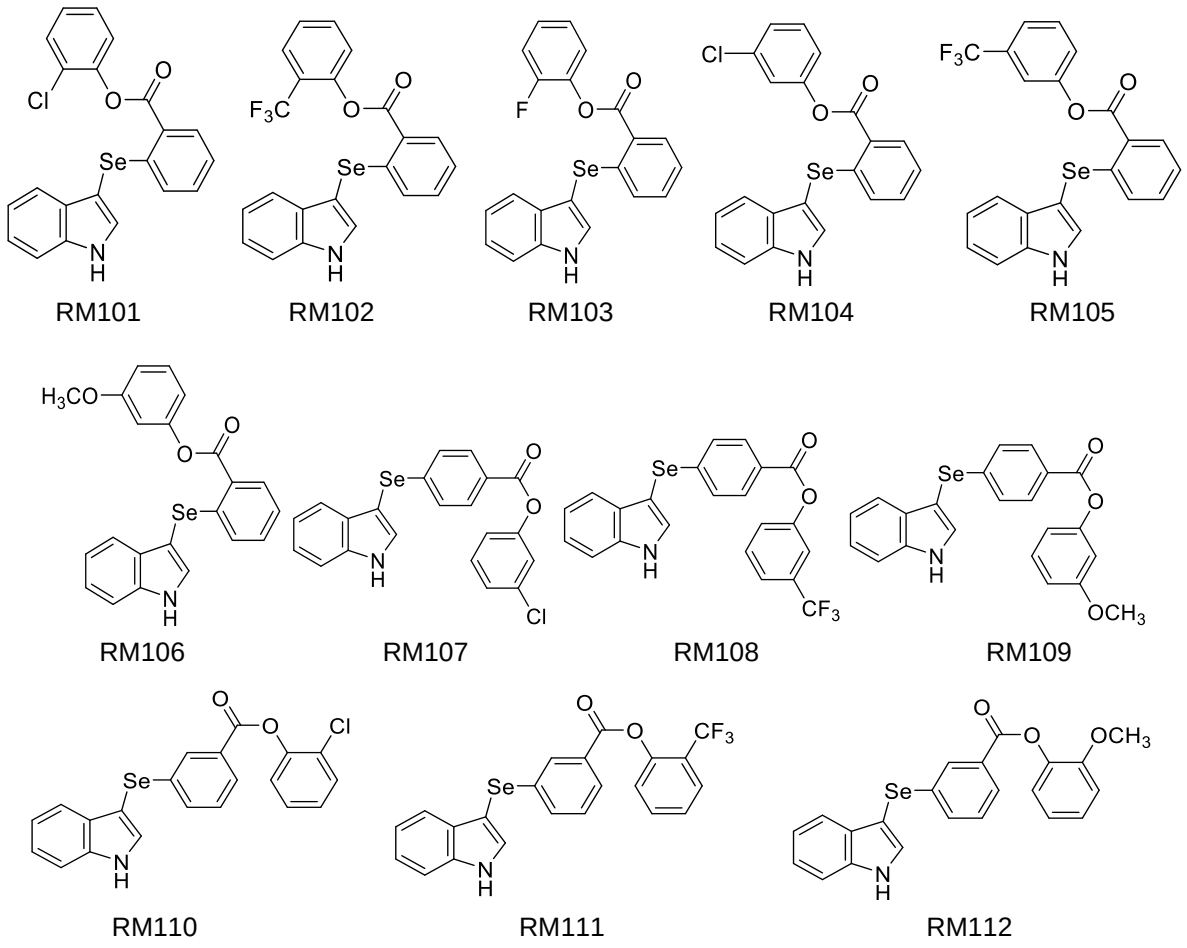
Por fim, analisando a árvore de arenavírus infecciosos, é visível a ancestralidade de algumas sequências obtidas, posto que estão mais distantes dentro do grupo e, por isso, divergem antes (Figura 19C). Com a constante mutação de vírus, um grande número de arenavírus ainda aguarda a sua descoberta, pois a variedade de hospedeiros e locais amostrados ainda é limitada. Assim, com esses futuros relatos, espera-se que se consiga compreender o grau em que genomas arenavirais e genomas do hospedeiro interagem para compor a manifestação da doença.

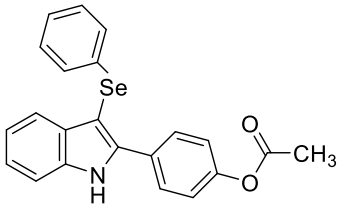
5.2 QUIMIOTECA DE SELENILINDÓIS

Foram propostos 21 compostos inéditos que mantinham o farmacóforo original da molécula 4816-0013 de Lu e colaboradores (2014) (Figura 20). Esses candidatos foram desenvolvidos e otimizados a partir de uma metodologia sintética para construção de indóis substituídos com selênio. Dessa forma, os compostos que apresentarem os melhores resultados na análise *in silico* serão sintetizados a partir de uma rota sintética já estabelecida e otimizada.

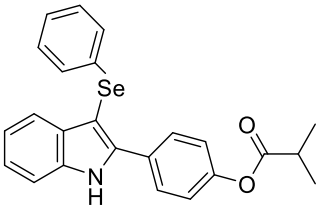
Os selenilindóis propostos foram separadas em dois grupos: no primeiro grupo, o selênio é inserido na terceira posição do núcleo indólico e, no segundo grupo, propomos moléculas dissubstituídas tanto na posição 3, com a incorporação de selênio, quanto na posição 2, funcionalizados com derivados de acetato de fenila.

Figura 20 – Selenilindóis do grupo 1 (RM101 – RM112) e do grupo 2 (RM201-RM209).

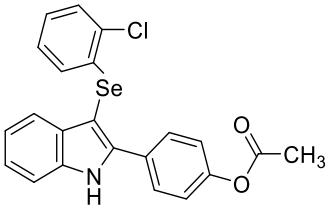




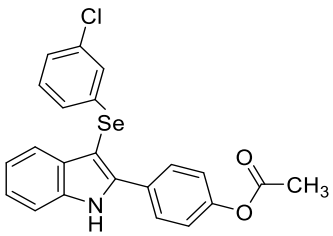
RM201



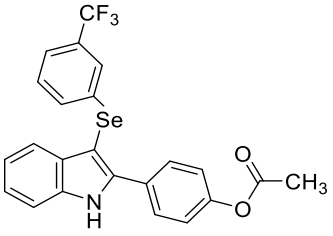
RM202



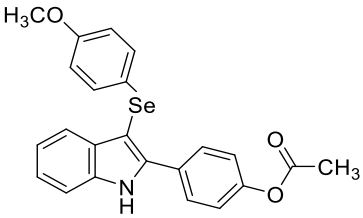
RM203



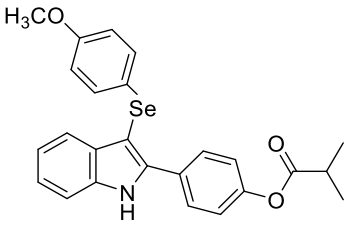
RM204



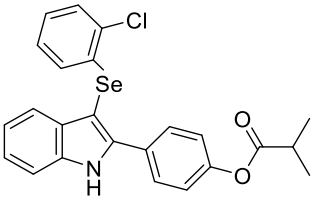
RM205



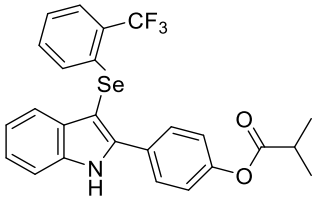
RM206



RM207



RM208



RM209

Fonte: autoral.

5.3 SELEÇÃO DE CANDIDATOS: ANÁLISE *in silico*

5.3.1 Análise Farmacocinética

Um princípio ativo é eficaz quando alcança a circulação sanguínea (absorção - A) e interage com o sítio específico de ação (distribuição - D), é possível que esse fármaco possa ser biotransformado em outras substâncias químicas (metabolismo - M) durante o processo, mas deve, por fim, ser expelido do organismo (excreção - E) (MODA, 2011). Dessa forma, para a avaliação dessas propriedades ADME, foram obtidos resultados de três plataformas diferentes que corroboraram para uma análise mais significativa. Os resultados obtidos com a plataforma SwissADME (Tabela 7) mostraram-se importantes para a avaliação de druglikeness dos compostos selenilindólicos. Além disso, as propriedades calculadas com a plataforma admetSAR 2.0 (Tabela 6) indicaram resultados semelhantes aos resultados obtidos com a plataforma pkCSM (Tabela 8), apontando maior confiança para os testes *in silico* realizados.

Tabela 6 – Principais resultados de propriedades farmacocinéticas obtidos pela plataforma admetSAR 2.0.

	Propriedades fisico-químicas				Absorção				Distri	Metabolismo				
	D-LH	A-LH	LR	AlogP	logS	GI	BS	Pgp	BHE	c1A2	c2C19	c2C9	c2D6	c3A4
RM101	1	2	4	3.70	-5.05	S	S	I	S	I	I	I	Não	S
RM102	1	2	4	4.06	-5.08	S	S	I	S	I	I	I	Não	S
RM103	1	2	4	3.18	-4.55	S	S	I	S	I	I	I	Não	S
RM104	1	2	4	3.70	-5.05	S	S	Não	S	I	I	Não	Não	S
RM105	1	2	4	4.06	-5.08	S	S	I	S	I	I	I	Não	S
RM106	1	3	5	3.05	-5.82	S	S	I	S	I	I	I	Não	S/I
RM107	1	2	4	3.70	-4.61	S	S	Não	S	I	I	Não	Não	S
RM108	1	2	4	4.06	-4.96	S	S	I	S	I	I	Não	Não	S
RM109	1	3	5	3.05	-3.74	S	S	I	S	I	Não	Não	Não	S
RM110	1	2	4	3.70	-5.04	S	S	Não	S	I	I	Não	Não	S
RM111	1	2	4	4.06	-5.08	S	S	I	S	I	I	I	Não	S
RM112	1	3	5	3.05	-3.71	S	S	I	S	I	I	Não	Não	S/I
RM201	1	2	4	3.42	-4.41	S	Não	Não	S	I	I	S/I	Não	S
RM202	1	2	5	4.05	-4.57	S	Não	I	S	I	I	I	Não	S
RM203	1	2	4	4.07	-5.24	S	Não	Não	S	I	I	I	Não	S
RM204	1	2	4	4.07	-5.24	S	S	Não	S	I	I	I	Não	S
RM205	1	2	4	4.43	-5.29	S	Não	I	S	I	I	S/I	Não	S
RM206	1	3	5	3.42	-4.17	S	Não	I	S	I	I	I	Não	S/I
RM207	1	3	6	4.06	-4.48	S	Não	I	S	I	I	I	Não	S/I
RM208	1	2	5	4.70	-5.31	S	S	I	S	I	I	I	Não	S
RM209	1	2	5	5.07	-5.49	S	Não	I	S	I	I	I	Não	S

D-LH, número de doadores de ligação de hidrogênio; **A-LH**, número de aceptores de ligação de hidrogênio; **LR**, número de ligações rotáveis; **GI**, absorção gastro intestinal; **BS**, score de biodisponibilidade; **Pgp**, inibidor de P-glicoproteína; **BHE**, permeável a barreira hematoencefálica; **c1A2**, CYP1A2; **c2C19**, CYP2C19; **c2C9**, CYP2C9; **c2D6**, CYP2D6; **c3A4**, CYP3A4 [**S**, substrato / **I**, inibidor].

Fonte: autoral.

Tabela 7 – Principais resultados de propriedades farmacocinéticas obtidos pela plataforma SwissADME.

	Propriedades físico-químicas							Absorção			Distri	Metabolismo				
	MM	D-LH	A-LH	LR	RM	TPSA	logP	logS	GI	BS	BHE	c1A2	c2C19	c2C9	c2D6	c3A4
RM101	426.75	1	2	5	106.2	42.09	4.46	-6.36	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM102	460.31	1	5	6	106.2	42.09	4.78	-6.36	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM103	410.30	1	3	5	101.1	42.09	4.35	-5.82	Alta	0.55	S	I	I	I	I	Não
RM104	426.75	1	2	5	106.2	42.09	4.46	-6.36	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM105	460.31	1	5	6	106.2	42.09	4.78	-6.36	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM106	422.34	1	3	6	107.7	51.32	3.61	-5.88	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM107	426.75	1	2	5	106.2	42.09	4.46	-6.36	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM108	460.31	1	5	6	106.2	42.09	4.78	-6.36	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM109	422.34	1	3	6	107.7	51.32	3.61	-5.88	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM110	426.75	1	2	5	106.2	42.09	4.46	-6.36	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM111	460.31	1	5	6	106.2	42.09	4.78	-6.36	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM112	422.34	1	3	6	107.7	51.32	3.61	-5.88	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM201	406.34	1	2	5	106.7	42.09	3.93	-5.72	Alta	0.55	S	I	Não	I	I	I
RM202	434.39	1	2	6	116.3	42.09	4.35	-6.80	Alta	0.55	S	I	Não	I	I	I
RM203	440.78	1	2	5	111.7	42.09	4.41	-6.37	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM204	440.78	1	2	5	111.7	42.09	4.41	-6.37	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM205	474.33	1	5	6	111.7	42.09	4.72	-6.63	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM206	436.36	1	3	6	113.2	51.32	3.56	-5.88	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM207	464.42	1	3	7	122.8	51.32	3.98	-6.96	Alta	0.55	S	Não	I	I	I	I
RM208	468.83	1	2	6	121.3	42.09	4.83	-7.45	Alta	0.55	S	I	I	I	I	I
RM209	502.39	1	5	7	121.3	42.09	5.13	-7.71	Alta	0.17	Não	Não	I	Não	I	I

MM, Massa Molecular (g/mol); **TPSA**, Superfície Topológica de Área Polar (Å²);

Fonte: autoral.

Tabela 8 – Principais resultados de propriedades farmacocinéticas obtidos pela plataforma pkCSM.

	Propriedades físico-químicas				Absorção		Distribuição		Metabolismo					Excreção	
	D-LH	A-LH	LR	logP	logS	Pgp	BHE	SNC	c1A2	c2C19	c2C9	c2D6	c3A4	TC	sOCT2
RM101	1	2	4	3.69	-5.71	S/I	0.18	-0.79	I	I	I	I	S/I	-0.07	Não
RM102	1	2	4	4.06	-5.66	S/I	0.19	-0.75	I	I	I	Não	S/I	2.01	Não
RM103	1	2	4	3.18	-5.59	S/I	0.17	-0.81	I	I	I	I	S/I	1.93	Não
RM104	1	2	4	3.69	-5.19	S/I	0.34	-0.92	I	I	I	Não	S/I	-0.07	Não
RM105	1	2	4	4.06	-5.66	S/I	0.19	-0.75	I	I	I	Não	S/I	2.00	Não
RM106	1	3	5	3.05	-4.93	S/I	0.25	-2.26	I	I	I	Não	S/I	2.22	Não
RM107	1	2	4	3.69	-5.38	S/I	0.34	-0.93	I	I	I	Não	S/I	-0.08	Não
RM108	1	2	4	4.06	-5.74	S/I	0.21	-0.79	I	I	I	Não	S/I	1.99	Não
RM109	1	3	5	3.05	-5.01	S/I	0.25	-2.25	I	I	I	Não	S/I	2.20	Não
RM110	1	2	4	3.69	-5.75	S/I	0.21	-0.80	I	I	I	I	S/I	-0.07	Não
RM111	1	2	4	4.06	-5.70	S/I	0.22	-0.76	I	I	I	Não	S/I	2.00	Não
RM112	1	3	5	3.05	-4.98	I	0.24	-2.27	I	I	I	Não	S/I	2.23	Não
RM201	1	2	4	3.41	-4.68	S/I	0.31	-0.59	I	I	I	Não	S	2.21	Não
RM202	1	2	5	4.05	-5.06	S/I	0.03	-0.45	I	I	I	Não	S	2.28	Não
RM203	1	2	4	4.07	-4.78	S/I	0.32	-0.64	I	I	I	Não	S	-0.03	Não
RM204	1	2	4	4.07	-4.80	S/I	0.31	-0.61	I	I	I	Não	S	-0.03	Não
RM205	1	2	4	4.43	-4.87	S/I	0.28	-0.58	I	I	I	Não	S/I	2.18	Não
RM206	1	3	5	3.42	-4.52	S/I	-0.17	-2.11	I	I	I	Não	S/I	2.28	Não
RM207	1	3	6	4.06	-4.54	S/I	-0.33	-1.99	I	I	I	Não	S/I	2.40	Não
RM208	1	2	5	4.70	-5.10	S/I	0.04	-0.51	I	I	I	Não	S/I	-0.03	Não
RM209	1	2	5	5.07	-5.02	S/I	-0.004	-0.46	I	I	I	Não	S/I	2.25	Não

SNC, Sistema Nervoso Central; **TC**, Total Clearance (log ml/min/kg); **sOCT2**, Substrato renal OCT2.

Fonte: autoral.

As três plataformas utilizadas possibilitaram a comparação de propriedades de absorção, de distribuição, de metabolização e de excreção entre os selenilindóis através dos resultados calculados para cada composto, proporcionando uma avaliação de *druglikeness*. Dessa forma, foram utilizadas, como parâmetro de análise, as propriedades listadas nas três tabelas (Tabela 6, 7 e 8) para seleção das moléculas com melhor perfil farmacocinético.

Para análise teórica de biodisponibilidade oral desses candidatos, foi aplicada a "Regra dos Cinco". Esse estudo foi publicado por Lipinski (1997) e abrange cinco princípios para avaliação de propriedades físico-químicas para a melhora da biodisponibilidade oral de fármacos. Essas regras descrevem os limites para alguns parâmetros que podem levar a problemas de absorção e permeabilidade de moléculas em membranas celulares (LIPINSKI et al., 1997). O estudo de Lipinski identificou que a membrana de células absorve e permeia com mais facilidade compostos em que a massa molecular é menor ou igual a 500 Daltons; que o número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio, expresso pela soma de átomos de nitrogênio e oxigênio, é inferior ou igual a 10; que o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio, expresso pela soma de hidroxilas e aminas primárias, é inferior ou igual a 5; que a lipofilicidade da molécula, expressa pelo indicador logP, é menor ou igual a 5; e, por fim, que a área de superfície polar (PSA) é menor ou igual a 140 Å (LIPINSKI, 2004).

Moléculas de massa molecular menor que 500 Da são mais facilmente transportadas, difundidas e absorvidas quando comparadas com moléculas pesadas (AMMAR, 2017). Entretanto, segundo Veber (2002), o peso molecular não deve ser considerado um determinante, visto que bons resultados de biodisponibilidade oral provavelmente decorrem de outra propriedade relacionada à massa molecular. Para Veber, compostos que possuem menos de 10 ligações rotáveis – que são ligações simples, fora de um anel, ligado a um átomo não terminal - estão intrinsecamente relacionados a um peso molecular abaixo de 500 Da, e é essa a propriedade que possibilita a molécula a interagir com seu sítio ativo, posto que quanto mais flexível, mais fácil a interação com o alvo e, portanto, maior a biodisponibilidade oral (VEBER et al., 2002).

Outra análise quantitativa utilizada para comparação entre os compostos é a de Ghose (1999), em que, utilizando o banco de dados *Comprehensive Medicinal Chemistry* (CMC), forneceu limiares de algumas propriedades para a obtenção de uma biblioteca de compostos farmacóides. Segundo Ghose, mais de 80% dos compostos desse banco de dados apresentaram uma faixa de qualificação de alguns parâmetros; entre eles: o log P apresentou uma faixa de -0,4 e 5,6; o peso molecular indicou uma faixa de 160 e 480 Da; a refração molar deve estar

entre 40 e 130, com um valor médio de 97; e o número total de átomos deve ser entre 20 e 70, com um valor médio de 48 (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999).

Averiguando e comparando os valores fornecidos pelas três plataformas com os estudos de Lipinski, Veber e Ghose, foi possível constatar que apenas a molécula RM209 infringiu duas regras de Lipinski: apresentou, em todas as plataformas, massa molecular superior a 500Da e um logP superior a 5. O restante das moléculas apresentou resultados dentro dos parâmetros descritos pelos estudos de Veber e Ghose. Todavia, apesar de infringir duas regras, a molécula RM209 ainda deve ser testada *in silico* em relação à sua toxicidade, posto que os valores ultrapassados, tanto de massa molecular quanto de logP, foram mínimos.

Analisando cada parâmetro separadamente, temos que a lipofilicidade, indicada pelo valor do coeficiente de partição (logP), é determinada através da partição de uma substância entre as fases orgânica e aquosa (MODA, 2011). Essa propriedade é importante para avaliação de solubilidade, uma vez que, no organismo humano, o princípio ativo pode distribuir-se entre as estruturas apolares - como membranas celulares constituídas por bicamada lipídica - e entre soluções aquosas - como o plasma sanguíneo. Com isso, quanto menor o logP, mais hidrofílico é o composto e quanto maior o logP, mais hidrofóbico; quando logP é igual a 0, o composto tem a mesma afinidade por ambas as fases (LEITE DO CANTO, 2016). Assim, fármacos pouco solúveis em água apresentam boa permeabilidade na membrana por serem mais lipofílicos; porém, não apresentam uma ótima absorção por não se dissolverem nos fluidos corporais; e moléculas muito hidrofílicas apresentam problemas de permeabilidade, embora sejam bem absorvidas. Dessa forma, o grau de solubilidade influencia na absorção e na estabilidade do composto em contato com o organismo, podendo influenciar na escolha da forma de administração do fármaco para que ele seja melhor distribuído até o receptor final desejado (MODA, 2011). Posto isso, é importante ter um balanço de solubilidade e lipofilicidade e avaliar o que é mais interessante para a função final dos compostos estudados. Neste caso, como é de extrema importância que o composto seja capaz de permear as células humanas, a hidrofobicidade é essencial, fazendo com que compostos muito polares não sejam ideais para bloquear a interação intracelular da proteína Z com o complexo ESCRT-I humano.

Diretamente relacionada ao logP, a solubilidade em água designa e influencia como será a biodisponibilidade, absorção e distribuição dos fármacos. Para essa análise, todas as três plataformas apresentaram valores diferentes para as 21 moléculas. Essa propriedade é expressa pelo valor de logS e, segundo os resultados obtidos pela plataforma SwissADME, as moléculas testadas são consideradas pouco a moderadamente solúveis. Conforme os parâmetros da plataforma, as moléculas com melhor solubilidade são RM103, RM106, RM109, RM112,

RM201 e RM206, consideradas moderadamente solúveis. Portanto, são moléculas que apresentariam melhores resultados de absorção quando comparadas aos outros compostos e ainda apresentam boa lipofilicidade para permear a membrana celular. Além disso, corroborando com o indicativo de absorção, todas as plataformas apontaram bons índices de absorção pelo trato gastrointestinal.

A P-glicoproteína (P-gp) é uma bomba de transporte que intermedia a saída de xenobióticos de diversas células humanas. Dessa forma, a inibição da proteína melhora a entrega de agentes terapêuticos por aumentar o índice de absorção intestinal, porém os substratos dessa proteína têm sua biodisponibilidade reduzida (AMIN, 2013). Apesar de ser um importante parâmetro, as plataformas diferiram nos resultados dessa propriedade: a SwissADME indicou que todas as moléculas são substratos de P-gp; a pkCSM indicou que apenas RM112 não é substrato, mas que todas são inibidoras de P-gp, enquanto admetSAR resultou em 15 compostos inibidores, mas nenhuma molécula substrato. Como as respostas foram divergentes entre plataformas, os resultados referentes ao substrato e à inibição de P-glicoproteínas são inconclusivos.

A biodisponibilidade oral dos fármacos refere-se à porção que atinge a circulação sistêmica, e é influenciada pela combinação dos valores de solubilidade e lipofilicidade (MODA, 2011). Assim, como apresentado pela plataforma SwissADME, apenas a molécula RM209 apresentou um score de biodisponibilidade abaixo do desejável, o que era esperado pelos resultados mostrados anteriormente. A plataforma admetSAR, por sua vez, indicou que seis moléculas além da RM209 não apresentam boa disponibilidade oral: RM201, RM202, RM203, RM205, RM206 e RM207; o que só será comprovado com os ensaios *in vitro* e *in vivo.*

O estudo da distribuição dos fármacos é importante para a prevenção de toxicidade e de efeitos colaterais que uma molécula pode apresentar caso o seu alvo farmacológico não seja o cérebro. Com isso, a permeabilidade da membrana hematoencefálica é um parâmetro que deve ser considerado nessa pesquisa. Portanto, no estudo realizado observou-se que todos os compostos avaliados foram classificados como permeáveis à barreira hematoencefálica (BHE). Além disso, a plataforma pkCSM não apenas indicou que todas as moléculas apresentam algum grau de distribuição na BHE (logBB > 0.3 permeia a BHE, logBB > -1 não há distribuição para o cérebro), como também indicou algum grau de penetração no sistema nervoso central (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Esse resultado, portanto, indica a necessidade de uma análise mais criteriosa em ensaios futuros.

Por fim, quando falamos de metabolismo, é essencial o conhecimento sobre a interação das moléculas com os citocromos P450 (CYP), visto que esse é importante para a eliminação

de drogas por meio da biotransformação metabólica (fase I). A inibição das isoenzimas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) pode diminuir a metabolização de xenobióticos e é uma das principais causas de interações medicamentosas relacionadas à farmacocinética, levando a efeitos adversos devido ao menor clearance e acúmulo do medicamento ou de seus metabólitos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Em relação às moléculas estudadas, a baixa hidrofilia e alta lipofilia que os compostos apresentaram torna os candidatos mais suscetíveis ao metabolismo mediado por CYP, adquirindo maior caráter hidrofílico para que sejam mais facilmente excretadas pelo organismo (MODA, 2011). De fato, todas as plataformas indicaram que as moléculas são substrato da enzima CYP450 3A4, a qual está envolvida no metabolismo de mais de metade dos fármacos conhecidos atualmente.

A partir das plataformas utilizadas, foi possível comparar os resultados obtidos e inferir que os selenilindóis estudados são lipofílicos e, portanto, capazes de permear a membrana celular para atuar na interação Proteína Z-Tsg101. Além disso, apresentaram boa absorção intestinal e biodisponibilidade oral. Todavia, uma análise mais cuidadosa deve ser realizada durante os próximos ensaios em relação à permeabilidade da BHE e à inibição de enzimas do citocromo P450. O único composto que se destacou por não apresentar bons resultados na análise farmacocinética foi o selenilindol RM209.

5.3.2 Análise Farmacodinâmica

5.3.2.1 Toxicidade

A farmacodinâmica é a área que estuda a ação dos fármacos no organismo e seus consequentes efeitos fisiológicos. Dessa forma, a avaliação toxicológica dos compostos é uma das análises *in silico* mais utilizadas para prevenir gastos com moléculas que apresentarão resultados insatisfatórios em análises *in vitro.* Utilizando como base a semelhança a compostos tóxicos e o aprendizado de máquina, a plataforma ProTox II calculou e classificou a potencial toxicidade dos selenilindóis estudados, indicando a probabilidade de ocasionar hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade (Tabela 9). Para comparação dos resultados, também foi feita a análise toxicológica das moléculas com a substituição do selênio por oxigênio, com o intuito de identificar se houveram mudanças nas classificações dos compostos (Tabela 10). Os resultados foram determinantes para a seleção dos compostos candidatos às próximas etapas de estudos *in silico* e avaliações *in vitro*.

Tabela 9 - Resultados de toxicidade de todos selenilindóis utilizando a plataforma ProTox II.

	LD_{50} mg/kg	Classe	Similaridade	Acurácia	Hepatotox.	Imunotox.	Mutagen.
RM 101	345	4	46.9%	54.26%	A 58%		
RM 102	800	4	43.05%	54.26%	A 60%		
RM 103	1000	4	44.33%	54.26%	A 63%		
RM 104	345	4	46.84%	54.26%	A 58%		
RM 105	500	4	42.5%	54.26%	A 60%	A 80%	
RM 106	800	4	45.13%	54.26%		A 76%	A 55%
RM 107	345	4	48.65%	54.26%	A 59%		
RM 108	500	4	44.29%	54.26%	A 58%	A 64%	
RM 109	1000	4	47.24%	54.26%		A 58%	A 53%
RM 110	345	4	47.57%	54.26%	A 58%		
RM 111	800	4	42.72%	54.26%	A 60%		
RM 112	2000	4	46.08%	54.26%	A 53%		A 62%
RM 201	200	3	44.31%	54.26%	A 59%		
RM 202	495	4	43.7%	54.26%	A 53%		
RM 203	495	4	42.24%	54.26%	A 64%		
RM 204	200	3	42.29%	54.26%	A 64%		
RM 205	200	3	42.28%	54.26%	A 64%	A 62%	
RM 206	200	3	43.69%	54.26%	A 53%		A 51%
RM 207	495	4	43.1%	54.26%			
RM 208	500	4	41.89%	54.26%	A 61%		
RM 209	500	4	42.87%	54.26%	A 59%		

Fonte: autoral

Tabela 10 - Resultados de toxicidade dos compostos substituídos por oxigênio, utilizando ProTox II.

	LD_{50} mg/kg	Classe	Similaridade	Acurácia	Hepatotox	Imunotox
RM 101	2500	5	53.43%	67.38%	A 59%	
RM 102	600	4	53.71%	67.38%	A 61%	
RM 103	2200	5	50.67%	67.38%	A 63%	
RM 104	1551	4	52.2%	67.38%	A 59%	A 65%
RM 105	500	4	54.32%	67.38%	A 61%	A 91%
RM 106	1551	4	52.55%	67.38%		A 89%
RM 107	500	4	61.72%	68.07%	A 60%	
RM 108	500	4	60.43%	68.07%	A 60%	A 66%
RM 109	600	4	58.35%	67.38%		A 61%
RM 110	666	4	55.26%	67.38%	A 60%	
RM 111	500	4	54.13%	67.38%	A 62%	
RM 112	2000	4	55.75%	67.38%	A 52%	
RM 201	200	3	50.19%	67.38%	A 60%	
RM 202	495	4	48.96%	54.26%	A 54%	
RM 203	600	4	51%	67.38%	A 66%	
RM 204	600	4	49.02%	54.26%	A 66%	
RM 205	500	4	50.37%	67.38%	A 66%	A 71%
RM 206	200	3	49.4%	54.26%	A 53%	
RM 207	495	4	48.19%	54.26%		
RM 208	600	4	49.88%	54.26%	A 63%	
RM 209	600	4	50.71%	67.38%	A 61%	

Fonte: autoral.

Analisando a Tabela 9, a toxicidade dos compostos foi classificada como 3 e 4 com uma acurácia de 54,26% em todas elas, considerando uma escala de 1 (muito tóxico) a 6 (não tóxico). As moléculas consideradas mais tóxicas, apresentando um valor de 3 dentro dessa escala, foram RM201, RM204, RM205 e RM206. As moléculas que não apresentaram resultados de hepatotoxicidade foram RM106, RM109 e RM207. Todavia, tanto RM106 quanto RM105 apresentaram altas probabilidades de imunotoxicidade. Compostos que apresentaram probabilidade, em dois parâmetros, de provocar alguma toxicidade foram as RM102, RM103, RM107, RM111, RM203, RM207, RM208 e RM209.

A análise da classificação de toxicidade das moléculas com a substituição do selênio por oxigênio é indicada na Tabela 10. Como é possível observar, a toxicidade de algumas moléculas diminuiu (aumentando seu valor na escala de classificação); como é o caso das moléculas RM101 e RM103 que obtiveram um valor de 5 na classificação, apresentando melhora. Entretanto, todas as probabilidades de doenças ocasionadas por toxicidade aumentaram, como é indicado pelos altos valores de probabilidade de imunotoxicidade de três moléculas: RM105, RM106 e RM205. Por fim, as moléculas RM106, RM109 e RM207 continuaram a não apresentar hepatotoxicidade mesmo com a substituição do selênio.

Dessa forma, as moléculas com melhor perfil farmacodinâmico são as moléculas que apresentaram uma classificação de 4 na escala, e de 5 quando seu heteroátomo foi substituído. Além disso, os compostos que não apresentaram probabilidade de hepatotoxicidade também merecem destaque. A molécula que apresentou os melhores resultados por não indicar probabilidade de hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade foi a RM207. Portanto, levando em consideração que os resultados de ensaios computacionais não foram consensuais, a seleção das moléculas englobou um número grande de selenilindóis para continuação de estudos *in silico*.

Os compostos que apresentaram os melhores resultados de propriedades farmacodinâmicas foram: RM207, por não indicar nenhuma probabilidade toxicológica; RM101 e RM103, por apresentarem uma classificação de 5 quando substituídos por oxigênio; RM102, RM104, RM107, RM110, RM111, RM202, RM203 e RM208, por apresentarem apenas uma probabilidade de toxicidade; e RM108, RM109 e RM112, por não apresentarem altas probabilidades em nenhum indicador. Apesar do composto RM209 não ter apresentado bons resultados na análise farmacocinética, com indicadores um pouco excedentes; mostrou bons resultados nos testes toxicológicos *in silico*.

5.3.2.2 Alvos Moleculares

Com a análise toxicológica foram propostas algumas moléculas com melhor perfil farmacocinético, sendo que a molécula que mais se destacou foi a molécula RM207. Posto isso, para comparação de alvos moleculares em humanos e para avaliação de ação *off-target*, foi realizada a análise e comparação dos compostos 4816-0013 (Figura 21) e RM207 (Figura 22), na plataforma SwissTarget (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2019).

Figura 21 - Tabela obtida com a SwissTarget indicando possíveis alvos da molécula 4816-0013 em *Homo sapiens*.

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	P09917	CHEMBL215	Oxidoreductase		30 / 8
Dual specificity phosphatase Cdc25B	CDC25B	P30305	CHEMBL4804	Phosphatase		7 / 0
Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	P40763	CHEMBL4026	Transcription factor		9 / 0
P2X purinoceptor 7	P2RX7	Q99572	CHEMBL4805	Ligand-gated ion channel		85 / 0
Hypoxia-inducible factor 1 alpha	HIF1A	Q16665	CHEMBL4261	Transcription factor		19 / 0

Fonte: autoral.

Figura 22 - Tabela obtida pela plataforma SwissTarget com possíveis alvos da molécula RM207 em *Homo sapiens*.

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Protein kinase C theta	PRKCQ	Q04759	CHEMBL3920	Kinase		66 / 0
Protein kinase C delta	PRKCD	Q05655	CHEMBL2996	Kinase		51 / 0
Gamma-secretase	PSEN2 PSENEN NCSTN APH1A PSEN1 APH1B	P49810 Q9NZ42 Q92542 Q96BI3 P49768 Q8WW43	CHEMBL2094135	Protease		378 / 0
Monoglyceride lipase	MGLL	Q99685	CHEMBL4191	Enzyme		61 / 0
Acetylcholinesterase	ACHE	P22303	CHEMBL220	Hydrolase		185 / 0

Fonte: autoral.

Os resultados referentes a ambos os compostos mostram que não há uma boa probabilidade de um alvo ser encontrado em *Homo sapiens*, indicando que não há sobreposição de alvos – ou seja, não há mais de um sítio com alta probabilidade de ser considerado alvo molecular – ou ação em alvos não intencionais, consequentemente possivelmente não causando efeitos colaterais. Além disso, apesar do composto RM207 não apresentar nenhum alvo com alta probabilidade em nenhum resultado obtido, o indicativo de que o composto 4816-0013 também não apresenta alvos moleculares evidentes pode sugerir que o bloqueio e a inibição da interação entre a proteína Z do vírus e o Tsg101 do hospedeiro se dá pela interação específica entre a molécula e os domínios finais P[T/S]AP da proteína Z do vírus. Além disso, é importante considerar que o composto base apresentou bons resultados *in vitro*, mesmo também não indicando sítios ativos com alta probabilidade de serem considerados alvos moleculares.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através da análise da conservação evolutiva e estrutural dos domínios finais da proteína Z dos diferentes arenavírus hemorrágicos, foi possível identificar uma alta identidade na porção P[T/S]AP de interesse farmacológico, indicando que a interação responsável pelo brotamento do vírion pela membrana celular é conservada. Assim, candidatos a fármacos que atuam na inibição da interação proteína-proteína entre o domínio P[T/S]AP e o gene Tsg101 do complexo ESCRT-I humano, possuem um alvo farmacológico capaz de bloquear a reprodução de diferentes arenavírus, podendo atuar contra todas ou múltiplas destas febres hemorrágicas sul-americanas.

Assim, foram propostas moléculas análogas ao composto 4816-0013 desenvolvido por Lu e colaboradores (2014), o qual atua nesse sítio ativo e apresentou bons resultados *in vitro*. Com isso, foram indicados 21 selenilindóis que mantiveram o núcleo dessa molécula base para serem testados e analisados *in silico* para seleção dos compostos que apresentassem melhor propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Portanto, com as predições ADME-T de todas as moléculas, foi possível eliminar seis compostos que apresentaram maior toxicidade nos testes computacionais e, dessa forma, determinar as moléculas com maior potencial a antiarenavirais, com bom perfil farmacocinético e com menor probabilidade de apresentarem toxicidade *in vitro* e *in vivo*; são elas: RM101, RM102, RM103, RM104, RM107, RM108, RM109, RM110, RM111, RM112, RM202, RM203, RM207, RM208 e RM209. Assim, a partir de ensaios *in silico*, foi possível analisar e propor, preliminarmente, candidatos com potencial atividade antiviral contra arenavírus causadores de febres hemorrágicas sul-americanas.

Como perspectivas, seria promissora a incorporação de dados estruturais em simulações de *docking* para avaliar a afinidade entre esses compostos e os alvos selecionados. Além disso, também seria interessante sintizar os selenilindóis que forem mais bem avaliados *in silico* para testar *in vitro* e definir as moléculas mais promissoras a antiarenavirais.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. et al. Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 17, n. 4, p. 438–443, 2010.

AMIN, M. L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. **Drug Target Insights**, v. 7, p. DTI.S12519, 19 jan. 2013.

AMMAR, O. In silico pharmacodynamics, toxicity profile and biological activities of the Saharan medicinal plant Limoniastrum feei. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 3, 2017.

AMSTRONG, C.; LILLIE, R. D. Experimental Lymphocytic Choriomeningitis of Monkeys and Mice Produced by a Virus Encountered in Studies of the 1933 St . Louis Encephalitis Epidemic Authors (s): Charles Armstrong and R . D . Lillie Published by : Association of Schools of Public Healt. **Public health reports**, v. 49, n. 35, p. 1019–1027, 1934.

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. **Systematic Biology**, v. 55, n. 4, p. 539–552, 1 ago. 2006.

AZEREDO, J. B. et al. ChemInform Abstract: A Solvent- and Metal-Free Synthesis of 3-Chalcogenyl-indoles Employing DMSO/I 2 as an Eco-Friendly Catalytic Oxidation System. . **ChemInform**, v. 45, n. 39, p. no-no, 2014.

BANERJEE, P. et al. ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2018.

BELL, T. M. et al. Pathogenesis of Bolivian Hemorrhagic Fever in Guinea Pigs. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 1, p. 190–199, 2 jan. 2016.

BRIGGILER A.; ENRIA D.; FEUILLADE MR, M. J. Contagio interhumano e infeccion inaparente por virusJunin in matrimonios del area endemica de fiebre hemorragica Argentina. **Medicina (Buenos Aires)**, n. 47:565, 1987.

CALISHER, C. H. ; TZIANABOS, T. ; LORD, R. D. ; COLEMAN, P. H. Tamiami virus, a new member of the Tacaribe group. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 2, p. 520–26, 1970.

CASALS, J.; BUCKLEY, S. M. Lassa Fever, a New Virus Disease of Man from West Africa. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 4, p. 680–691, 1 jul. 1970.

CASTILLO, E. et al. Commensal and wild rodents in an urban area of Argentina. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, n. 3, p. 135–141, 2003.

CDC. No TitleBiological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response: Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, n. 49:1–14, 2000.

CHARREL, R. N.; DE LAMBALLERIE, X. Arenaviruses other than Lassa virus. **Antiviral Research**, v. 57, n. 1–2, p. 89–100, 2003.

CHARREL, R. N.; DE LAMBALLERIE, X. Zoonotic aspects of arenavirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 213–220, 2010.

CHENG, F. et al. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, 2012.

CHILDS, J. E.; PETERS, C. J. Ecology and Epidemiology of Arenaviruses and Their Hosts. **The Arenaviridae**, p. 331–384, 1993.

CHROSTOWSKA, A. et al. UV-Photoelectron Spectroscopy of BN Indoles: Experimental and Computational Electronic Structure Analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 33, p. 11813–11820, 20 ago. 2014.

COHEN-DVASHI, H. et al. Rational design of universal immunotherapy for TfR1-tropic arenaviruses. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. Selênio. In: **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes**. São Paulo, Brasil: Série de Publicações ILSI Brasil, 2009.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–13, 2017.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W357–W364, 2 jul. 2019.

DANG, C. C. et al. FLU, an amino acid substitution model for influenza proteins. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 99, 12 dez. 2010.

DAS, K.; ARNOLD, E. Negative-Strand RNA Virus L Proteins: One Machine, Many Activities. **Cell**, v. 162, n. 2, p. 239–241, jul. 2015.

DE MELLO MALTA, F. et al. Sabiá virus-like mammarenavirus in patient with fatal hemorrhagic fever, Brazil, 2020. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 1332–1334, 2020.

DOWNS, W. G. et al. Tacaribe Virus, a New Agent Isolated from Artibeus Bats and Mosquitoes in Trinidad, West Indies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 12, n. 4, p. 640–646, 1 jul. 1963.

DU, H.-A. et al. Iron-Facilitated Iodine-Mediated Electrophilic Annulation of N,N-Dimethyl-2-alkynylanilines with Disulfides or Diselenides. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 14–15, p. 2739–2748, out. 2011.

FEHLING, S. K.; LENNARTZ, F.; STRECKER, T. Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2973–3011, 2012.

FENNER, F. Classification and nomenclature of viruses. Second report of the international committee on taxonomy of viruses. **Intervirology**, v. 7, p. 115, 1976.

FERREIRA, N. L. **Síntese ambientalmente adequada de 3-selenil-indóis**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

FERREIRA, N. L. et al. Synthesis of 3-Selenylindoles under Ecofriendly Conditions. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 23, p. 5070–5074, 2015.

FERRERO, S. et al. Antibody-based inhibition of pathogenic New World Hemorrhagic Fever mammarenaviruses by steric occlusion of the human transferrin receptor 1 apical domain. **Journal of Virology**, n. June, 2021.

FRANK, M. G. et al. South American Hemorrhagic Fevers: A summary for clinicians. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 105, p. 505–515, 2021.

GAUDIN, R.; KIRCHHAUSEN, T. Superinfection exclusion is absent during acute Junin virus infection of Vero and A549 cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–8, 2015.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, 12 jan. 1999.

GUINDON, S. et al. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 29 mar. 2010.

HELGUERA, G. et al. An Antibody Recognizing the Apical Domain of Human Transferrin Receptor 1 Efficiently Inhibits the Entry of All New World Hemorrhagic Fever Arenaviruses. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 4024–4028, 2012.

HERRING, S. et al. Inhibition of arenaviruses by combinations of orally available approved drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 1–17, 2021.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. DE. Glutationa e enzimas

relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

JOHNSON, K. M. et al. Virus Isolations from Human Cases of Hemorrhagic Fever in Bolivia. **Experimental Biology and Medicine**, v. 118, n. 1, p. 113–118, 1 jan. 1965.

KANG, H. et al. Structural basis for recognition and regulation of arenavirus polymerase L by Z protein. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2021.

KIM, Y. J.; VENTURINI, V.; DE LA TORRE, J. C. Progress in anti-mammarenavirus drug development. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1–18, 2021.

KRANZUSCH, P. J. et al. Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 46, p. 20069–20074, 2010.

KUHN, J. H. et al. 2020 taxonomic update for phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. **Archives of Virology**, v. 165, n. 12, p. 3023–3072, 4 dez. 2020.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J.-E.; GASCUEL, O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 9, p. 2422–2424, 1 set. 2017.

LEITE DO CANTO, E. O que é coeficiente de partição? **Informe-se sobre a química**, v. 55, 2016.

LI, H.; WANG, X.; YAN, J. Selective synthesis of 3-Selanylindoles from Indoles and Diselenides using IK/mCPBA system. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 31, n. 12, p. 1–6, 2017.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, dez. 2004.

LU, J. et al. A Host-Oriented Inhibitor of Junin Argentine Hemorrhagic Fever Virus Egress. **Journal of Virology**, v. 88, n. 9, p. 4736–4743, 2014.

LUKASHEVICH, I. S.; DE LA TORRE, J. C. Special issue “arenaviruses 2020”. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 1–5, 2021.

LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 229–243, 2002.

LUO, D. et al. Copper-Catalyzed Three-Component Reaction for Regioselective Aryl-

and Heteroarylselenation of Indoles using Selenium Powder. **Journal of Organic Chemistry**, v. 81, n. 11, p. 4485–4493, 2016.

MAES, P. et al. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. **Archives of Virology**, v. 163, n. 8, p. 2295–2310, 21 ago. 2018.

MAIER, K. E. et al. A New Transferrin Receptor Aptamer Inhibits New World Hemorrhagic Fever Mammarenavirus Entry. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 5, n. April, p. e321, 2016.

MAIZTEGUI, J. I. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 52, n. 4- 5 6, p. 567–575, 1975.

MAIZTEGUI, J. I. et al. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against argentine hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 2, p. 277–283, 1998.

MASI, E. et al. Socioeconomic and environmental risk factors for urban rodent infestation in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Pest Science**, v. 83, n. 3, p. 231–241, 2010.

MCELREATH, R. **Statistical Rethinking: A Bayesian Course with Examples in R and Stan**. 1ª edição ed. [s.l: s.n.].

MILLS, J. N. et al. Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 5, p. 554–562, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, B. Classificação de Risco dos Agentes Biológicos. **MS**, 2006.

MODA, T. L. **Modelagem In silico de propriedades farmacocinéticas para a avaliação de candidatos a novos fármacos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

MOOLLA, N.; WEYER, J. **The arenaviridae**. [s.l: s.n.].

MORENO, H. et al. Ribavirin Can Be Mutagenic for Arenaviruses. **Journal of Virology**, v. 85, n. 14, p. 7246–7255, 15 jul. 2011.

MURPHY, F. A. et al. Arenoviruses in Vero Cells: Ultrastructural Studies. **Journal of Virology**, v. 6, n. 4, p. 507–518, out. 1970.

MURPHY, F. A. Arenavirus taxonomy: a review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 52, n. 4- 5 6, p. 389–391, 1975.

NCBI, P. **NCBI**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>. Acesso em: 5 fev. 2021.

NICKLE, D. C. et al. HIV-Specific Probabilistic Models of Protein Evolution. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e503, 6 jun. 2007.

PARKER, W. B. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. **Virus Research**, v. 107,

n. 2, p. 165–171, fev. 2005.

PARODI, A. S.; GREENWAY, D. J.; RUGIERO, H. R.; RIVERO, E.; FRIGERIO, M.; DE LA BARRERA, J. M.; & NOTA, N. Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. **Día Médico**, v. 30, n. 2300–2301, 1958.

PEREZ, M.; CRAVEN, R. C.; DE LA TORRE, J. C. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: Implications for antiviral strategies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 22, p. 12978–12983, 2003.

PETERS, C. J.; GOLD, E. Textbook of Human Virology. In: **JAMA: The Journal of the American Medical Association**. [s.l: s.n.]. v. 266p. 282.

PICCONE, M. E.; FLORES, E. F. Replicação dos Vírus RNA. In: **Virologia Veterinária**. [s.l.] editora UFSM, 2007. p. 165.

PINHEIRO, F. P. et al. Amapari, a New Virus of the Tacaribe Group from Rodents and Mites of Amapa Territory, Brazil. **Experimental Biology and Medicine**, v. 122, n. 2, p. 531–535, 1 jun. 1966.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015.

PONTREMOLI, C.; FORNI, D.; SIRONI, M. Arenavirus genomics: novel insights into viral diversity, origin, and evolution. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 18–28, 2019.

PRABI. **NPS@**. Disponível em: <https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html>. Acesso em: 5 fev. 2021.

PROMED (DISEASES, I. S. FOR I. **Chapare virus - Bolivia: (LP) person-to-person transmission, 2019**. Disponível em: <https://promedmail.org/>.

RADOSHITZKY, S. R. et al. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 92–96, 2007.

RADOSHITZKY, S. R. et al. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. **Archives of virology**, v. 160, n. 7, p. 1851–1874, 2015.

RAMBAUT, A. **FigTree**. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).>. Acesso em: 20 out. 2021.

RAPP, FRED; M. BUCKLEY, S. Studies with the etiologic agent of argentinian epidemic hemorrhagic fever (Junin virus). **The American journal of pathology**, v. 40, n. 1, p. 63, 1962.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233–241, jul. 2000.

ROTRUCK, J. T. et al. Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. **Science**, v. 179, n. 4073, p. 588–590, 9 fev. 1973.

ROWE, W. P. et al. Arenoviruses: Proposed Name for a Newly Defined Virus Group. **Journal of Virology**, v. 5, n. 5, p. 651–652, 1970.

SARUTE, N.; ROSS, S. R. New World Arenavirus Biology. **Annual Review of Virology**, v. 4, p. 141–158, 2017.

SIMULUNDU, E. et al. Lujo viral hemorrhagic fever: considering diagnostic capacity and preparedness in the wake of recent Ebola and Zika virus outbreaks. **Reviews in Medical Virology**, v. 26, n. 6, p. 446–454, 2016.

STENGLEIN, M. D. et al. Identification, Characterization, and In Vitro Culture of Highly Divergent Arenaviruses from Boa Constrictors and Annulated Tree Boas: Candidate Etiological Agents for Snake Inclusion Body Disease. **mBio**, v. 3, n. 4, 31 ago. 2012.

TRAPIDO, H.; SANMARTÍN, C. Pichindé Virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, n. 4, p. 631–641, 1 jul. 1971.

TRAUB, E. **Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses**. 1. ed. Berlin, Heidelberg and New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1973.

URATA, S. et al. Cellular Factors Required for Lassa Virus Budding. **Journal of Virology**, v. 80, n. 8, p. 4191–4195, 2006.

URATA, S.; YASUDA, J. Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. **Viruses**, v. 4, n. 10, p. 2049–2079, 2012.

VAINRUB, B.; SALAS, R. LATIN AMERICAN HEMORRHAGIC FEVER. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 8, n. 1, p. 47–59, mar. 1994.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 1 jun. 2002.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1ª ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2014.

WEBB, P. A. et al. Parana, a new tacaribe complex virus from Paraguay. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 32, n. 4, p. 379–388, dez. 1970.

WEBB, P. A. et al. Behavior of Machupo and Latino Viruses in Calomys callosus from Two Geographic Areas of Bolivia. In: **Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1973. p. 313–322.

WESTOVER, J. B. et al. Low-dose ribavirin potentiates the antiviral activity of favipiravir against hemorrhagic fever viruses. **Antiviral Research**, v. 126, p. 62–68, fev. 2016.

WILDY, P. (BIRMINGHAM). **Classification and Nomenclature of Viruses - 1st**

Report of the International Committee on Nomenclature of Viruses. [s.l: s.n.].

WOLFF, S.; EBIHARA, H.; GROSETH, A. Arenavirus budding: A common pathway with mechanistic differences. **Viruses**, v. 5, n. 2, p. 528–549, 2013.

YANG, H. et al. AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067–1069, 2019.

ZAPATA, J. C.; SALVATO, M. S. Arenavirus variations due to host-specific adaptation. **Viruses**, v. 5, n. 1, p. 241–278, 2013.

ZIMMERMANN, E. G. et al. A selenium-based ionic liquid as a recyclable solvent for the catalyst-free synthesis of 3-selenylindoles. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4081–4090, 2013.