

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

João Pedro Nunes Sagini

**Vírus Rocio – Estratégias de
modelagem e reposicionamento de
fármacos para uma doença
emergente negligenciada**

UFCSPA
Porto Alegre
2021
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

João Pedro Nunes Sagini

Vírus Rocio – Estratégias de modelagem e reposicionamento de fármacos para uma doença emergente negligenciada

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Rodrigo Ligabue Braun

**Porto Alegre
2021**

Catálogo na Publicação

Nunes Sagini, João Pedro

Vírus Rocio – Estratégias de modelagem e reposicionamento de fármacos para uma doença emergente negligenciada / João Pedro Nunes Sagini. -- 2021.

82 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2021.

Orientador(a): Rodrigo Ligabue Braun.

1. Reposicionamento de Fármacos. 2. Vírus Rocio. 3. Arboviroses. 4. Atracamento Molecular. I. Título.

INSTITUIÇÃO E FONTE FINANCIADORA

O presente trabalho foi desenvolvido junto à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e foi subvencionado pelo financiamento direto ao PPGBio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar este trabalho àqueles que estiveram presentes neste momento tão especial em minha vida acadêmica, mesmo dentro deste período tão delicado para a ciência brasileira.

Agradeço a meu namorado, companheiro de rotina e jornada científica Thailan, pela paciência, incentivo, honestidade e carinho.

Ainda, agradeço aos meus queridos Vitória, Francine e Dérik pelo apoio, franqueza e amizade.

Por fim, agradeço ao meu orientador Rodrigo, pela confiança no desenvolvimento deste trabalho, dedicação e apoio, bem como pela representatividade cada vez mais necessária nos espaços de construção de conhecimento.

*“[...] de um começo tão simples evoluíram
e continuam a evoluir
infindáveis formas belíssimas e fascinantes.”*

Charles Darwin

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	7
RESUMO.....	8
INTRODUÇÃO.....	11
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
1.1 Considerações sobre doenças infecciosas emergentes.....	11
1.2 Arboviroses e sua importância epidemiológica no Brasil.....	12
1.3 Características gerais das arboviroses.....	13
1.4 Vírus Rocio.....	20
1.4.1 Aspectos moleculares do vírus Rocio.....	25
1.5 Reposicionamento de fármacos – uma estratégia racional para o tratamento de infecções emergentes	28
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
5. DISCUSSÃO.....	59
6. APÊNDICES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
CURRÍCULO LATTES.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Å	Ångström
ADE	Aprimoramento dependente de anticorpo
BSQV	<i>Bussuquara virus</i>
C	Proteína do Capsídeo
CHKV	<i>Chikungunya virus</i>
CPCV	<i>Cassipacore virus</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
E	Proteína do Envelope
ILHV	<i>Ilhéus virus</i>
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
MVEV	<i>Murray Valley encephalitis virus</i>
NS1	Proteína Não-estrutural 1
NS2A	Proteína Não-estrutural 2A
NS2B	Proteína Não-estrutural 2B
NS3	Proteína Não-estrutural 3
NS4A	Proteína Não-estrutural 4A
NS4B	Proteína Não-estrutural 4B
NS5	Proteína Não-estrutural 5
prM	Precursor da Membrana
ROCV	<i>Rocio virus</i>
SLEV	<i>Saint Louis encephalitis virus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow Fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Quadro 1. Classificação das principais arboviroses (adaptado de Lopes *et al.*, 2014);

Figura 1. Principais famílias e gêneros representantes dos arbovírus.
SsRNA – RNA fita simples negativa; ss+RNA – RNA fita simples positiva
(adaptado de Young, 2018).

Figura 2. Organização genômica dos flavivírus e suas proteínas estruturais e não estruturais resultantes (adaptado de Campos *et al.*, 2018).

Figura 3. Ciclo infectivo dos flavivírus (adaptado de Campos *et al.*, 2018).

Figura 4. Região do Vale do Ribeira (SP) (adaptado de Iversson, 1980).

Figura 5. Filogenia dos arbovírus (adaptado de Medeiros *et al.*, 2007).

RESUMO

As doenças arbovirais têm alta incidência no Brasil e constituem um grave problema de saúde pública. O Rocio vírus (ROCV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, responsável pelo surgimento de um surto de encefalite no litoral paulista no final da década de 1980. Embora nenhum caso recente dessa infecção viral tenha sido relatado, os dados sugerem a circulação do ROCV em todo o território brasileiro. Diante desses indícios e da forte presença de fatores fundamentais para o ressurgimento de doenças emergentes no Brasil, este trabalho visa obter, a partir de rastreamentos virtuais, possíveis alvos e moléculas terapêuticas redirecionadas para o combate a infecções relacionadas ao ROCV. Para isso, realizamos a predição da estrutura molecular de proteínas por similaridade utilizando a plataforma I-TASSER, baseado na anotação mais recente do genoma do vírus. A partir desta predição, realizamos o atracamento molecular de fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e demonstramos que a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Sistema Único de Saúde (SUS) contém diversas moléculas que podem ser redirecionadas para o combate a esse flavivírus, como simeprevir, daclatasvir, iloprost e itraconazol. Dentre eles, o itraconazol mostrou-se um candidato interessante, pois interage com 12 dos 16 alvos proteicos estruturais e não estruturais desse vírus.

Palavras-chave:

Reposicionamento de fármacos

Infecção emergente

Atracamento molecular

Vírus Rocio

NS1

ABSTRACT

Arboviral diseases have high incidence in Brazil and constitute a serious public health problem. Rocio virus (ROCV) is an arbovirus belonging to the family *Flaviviridae* responsible for the appearance of an outbreak of encephalitis on the São Paulo state coast in the late 1970s. Although no recent case of this viral infection has been reported, data suggest the circulation of ROCV throughout the Brazilian territory. Given these indications and the strong presence of fundamental factors for the resurgence of emerging diseases in Brazil, this work aims to obtain, from virtual screenings, possible targets and therapeutic molecules redirected to fight infections related to ROCV. For this, we performed the prediction of the molecular structure of proteins by similarity using the I-TASSER platform, based on the most recent annotation of the virus genome. Based on this prediction, we performed the molecular docking of drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) and demonstrated that the National List of Essential Medicines of the Unified Health System (SUS) contains several molecules that can be redirected to fight this flavivirus, such as simeprevir, daclatasvir, iloprost and itraconazole. Among them, itraconazole proved to be an interesting candidate, as it interacts with 12 of the 16 structural and non-structural proteins of this virus.

Keywords:

Drug repurposing
Emergent infection
Molecular docking
Rocio Virus
NS1

INTRODUÇÃO

1. Referencial teórico

1.1 Considerações sobre doenças infecciosas emergentes

Uma doença infecciosa pode ser caracterizada como emergente quando afeta pela primeira vez uma população, ou quando existia previamente e ressurgue com um aumento do número de casos e em uma área de incidência diferente da reportada anteriormente. Além disso, estas doenças podem ser classificadas como re-emergentes, aparecendo com novas formas clínicas frequentemente severas (OMS, 2014; Morse & Schluederberg, 1990).

Estas doenças emergentes envolvem diversos fatores biológicos, sociais e ambientais. Estima-se que 15% de todos os patógenos humanos são responsáveis por causar doenças emergentes, sendo 75% destas doenças emergentes de origem zoonótica. Estas doenças são transmitidas de animais para humanos por contato direto, água, comida, sendo mais comumente disseminadas por vetores. Dentre elas podemos citar a doença de Lyme, a dengue, a chikungunya, a febre amarela e a febre do oeste do Nilo (CDC, 2018; McArthur, 2019; WHO, 2010).

O aumento destas doenças infecciosas impacta diretamente na macroeconomia e a predição de custo estimado para os setores de saúde e produção se torna limitado, dificultando as medidas de combate à infecção dos países atingidos. Em estudo do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), estimou-se que os custos socioeconômicos da epidemia de Zika em países da América do Sul e Caribe, como Brasil, Colômbia e Suriname, totalizaria entre 7 a 18 bilhões de dólares entre os anos de 2015-2017. Além dos setores da saúde e produção, estes valores também afetam o turismo, que movimenta a economia de diversos países em desenvolvimento (Smith *et al.*, 2019; UNPD, 2017).

O fortalecimento do sistema de saúde pública é fundamental para a prevenção, manejo e tratamento de doenças emergentes. Este fortalecimento deve ser coordenado em nível nacional, com ações aplicadas a nível local. O nível de sucesso dessa coordenação reflete diretamente o desenvolvimento da sociedade.

1.2 Arboviroses e sua importância epidemiológica no Brasil

O Brasil possui uma das maiores áreas de extensão do mundo, com cerca de 8.500.000 km², e uma conhecida variabilidade climática em suas regiões. Por estar situado em zonas de latitudes baixas, há a prevalência de um clima tropical quente e úmido, com temperaturas médias em torno dos 20°C. Somado ao fato da urbanização desordenada e de graves problemas associados à falta de planejamento estratégico, como desmatamento, acúmulo de lixo e falta de saneamento ambiental – onde cerca de 5 milhões de domicílios possuem esgoto a céu aberto em seu entorno –, se tornou possível o estabelecimento e desenvolvimento de diversos vetores com impacto na saúde humana (Duarte *et al.*, 2019; IBGE, 2010; Viana & Ignotti, 2013).

Do ponto de vista sanitário, a presença de vetores possivelmente transmissores de doenças nas áreas periurbanas pode ser um risco para a disseminação de microrganismos patogênicos, como protozoários, bactérias e vírus. Destes, podemos destacar os arbovírus, termo introduzido na década de 1940 e utilizado para denominar vírus transmitidos por artrópodes (*arthropod-borne viruses*) para humanos e outros animais. São conhecidas cerca de 545 espécies de arbovírus, das quais 150 são patógenos humanos. No Brasil, 37 espécies de arbovírus são popularmente conhecidas, dentre elas: o vírus da dengue (DENV), da encefalite de Saint Louis (SLEV), o vírus Rocio (ROCV), do oeste do Nilo (WNV), Oropouche (OROV), Ihéus (ILHV), Mayaro (MAYV), Bussuquara (BUSV) e Iguape (IGUV) (Lopes *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 1996; WHO, 1985).

Em uma estudo de custos levantado por Teich e colaboradores (2017), estima-se que o manejo total de arboviroses tenha impactado em cerca de R\$ 2,6 bilhões para o país no ano de 2016. Este valor incluiu medidas de manejo do vetor, com um investimento entre 1,4 e 1,5 bilhão de reais. Destes, cerca de 78,6 milhões de reais foram investidos somente na aquisição de inseticidas e larvicidas pelo governo federal. Além disso, o custo total levou em consideração custos médicos diretos – que envolveram condutas de manejos ambulatoriais e hospitalares – e indiretos – relacionados ao afastamento laboral –, os quais alcançaram um custo cerca de 374 milhões e 431 milhões, respectivamente. Naquele ano, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro foram os estados brasileiros com maiores gastos relacionados à estas doenças.

Embora o combate aos vetores seja o foco das instituições de saúde nos dias atuais, dados apontam evidências da presença do mosquito *Aedes aegypti*, conhecido vetor do YFV, DENV, ZIKV e chikungunya (CHKV), no Brasil desde o século XVII. A primeira epidemia de febre amarela relatada ocorreu em Recife (PE), no ano de 1685, sendo relatada no ano seguinte na cidade de Salvador (BA). Além disso, foram relatados episódios de doenças com sintomas semelhantes à dengue nos estados de São Paulo e do Rio de Janeiro no ano de 1846, indicando o início de uma expansão do vetor pelo território brasileiro. O combate dos vetores no país, em especial em espécies do gênero *Aedes*, incitou também grandes campanhas de Oswaldo Cruz desde o início do século XX e reflete até os dias de hoje como um dos grandes desafios da saúde pública brasileira (Catão, 2012; Franco, 1969).

1.3 Características gerais das arboviroses

A atual emergência mundial de arboviroses é resultado da introdução antrópica de artrópodes infectados e de sua preferência alimentar, além de uma dispersão natural ocorrida devido aos movimentos migratórios de aves. Com o auxílio do aumento populacional e

urbanização, estes vírus foram transmitidos de seus hospedeiros silváticos para o ser humano, permitindo em muitos casos uma transmissão sem a necessidade de um reservatório natural nas matas. Além disso, a adaptação de diversos arbovírus em vetores comuns, como no caso do gênero *Aedes*, pode elicitar padrões ecológicos, epidemiológicos e evolutivos semelhantes destes microrganismos (Gould, 2018).

A manutenção destes microrganismos no ecossistema ocorre pela infecção de mamíferos hospedeiros por meio da picada de artrópodes hematófagos, como mosquitos, carrapatos e flebotomíneos, permitindo a replicação e viremia. Nesse caso, a retransmissão do vírus a outros mamíferos pode ocorrer pela ingestão de sangue infectado e subsequente multiplicação no aparelho bucal e reprodutivo dos artrópodes (WHO, 1985).

As infecções por arbovírus são assintomáticas na maioria dos casos, ou passam apenas por um período de sintomas inespecíficos, dificultando o diagnóstico de um arbovírus conhecido. Nos primeiros estágios, a doença pode se apresentar por picos febris e sintomas gastrointestinais e respiratórios. Apesar da inespecificidade de sintomas, as arboviroses evoluem para quadros clínicos distintos, desde doenças do sistema nervoso central até febres hemorrágicas (Lopes *et al.*, 2014; Young, 2018). As doenças relacionadas aos arbovírus estão representadas no quadro a seguir.

Os arbovírus relacionados a doenças emergentes no Brasil estão incluídos em três principais famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação das principais arboviroses (adaptado de Lopes *et al.*, 2014).

Família	Vírus	Quadro clínico
<i>Flaviviridae</i>	Dengue	Febre hemorrágica
	Encefalite de Saint Louis	Doença neurológica
	Oeste do Nilo	Doença neurológica
	Ilheus	Febre e doença neurológica
	Iguape	Indeterminado
<i>Togaviridae</i>	Rocio	Doença neurológica
	Mayaro	Febre e atralgia
<i>Bunyaviridae</i>	Chikungunya	Febre e atralgia
	Oropuche	Febre hemorrágica Doença neurológica

Os arbovírus da família *Togaviridae* estão inseridos principalmente em um único gênero: *Alphavirus*. São vírus envelopados, icosaédricos, de RNA fita simples polaridade positiva (ss+) com aproximadamente 11 kb (Figura 1). Os principais representantes desta família e gênero são o MAYV, CHIKV, vírus da encefalite equina do Leste (EEEV) (Lopes *et al.*, 2014).

A família *Bunyaviridae* é constituída por diversos gêneros capazes de infectar animais e plantas. Estes vírus são envelopados, circulares e possuem RNA fita simples polaridade negativa (ss-) (Figura 1). Podemos destacar o OROV, pertencente ao gênero *Orthobunyavirus* e segundo arbovírus mais frequente causador de quadros febris no país (Rodrigues et al., 2011; Young, 2018).

A família *Flaviviridae* pode ser considerada a mais importante representante por agrupar grande parte dos arbovírus de relevância clínica. São vírus envelopados, icosaédricos, RNA genômico fita simples polaridade positiva (ss+) (Figura 1). Esta família é composta por três gêneros principais: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. Cerca de 39 espécies de arbovírus estão incluídas no gênero *Flavivirus*, dentre elas DENV e seus sorotipos, ZIKV, WNV, YFV, ROCV e SLEV.

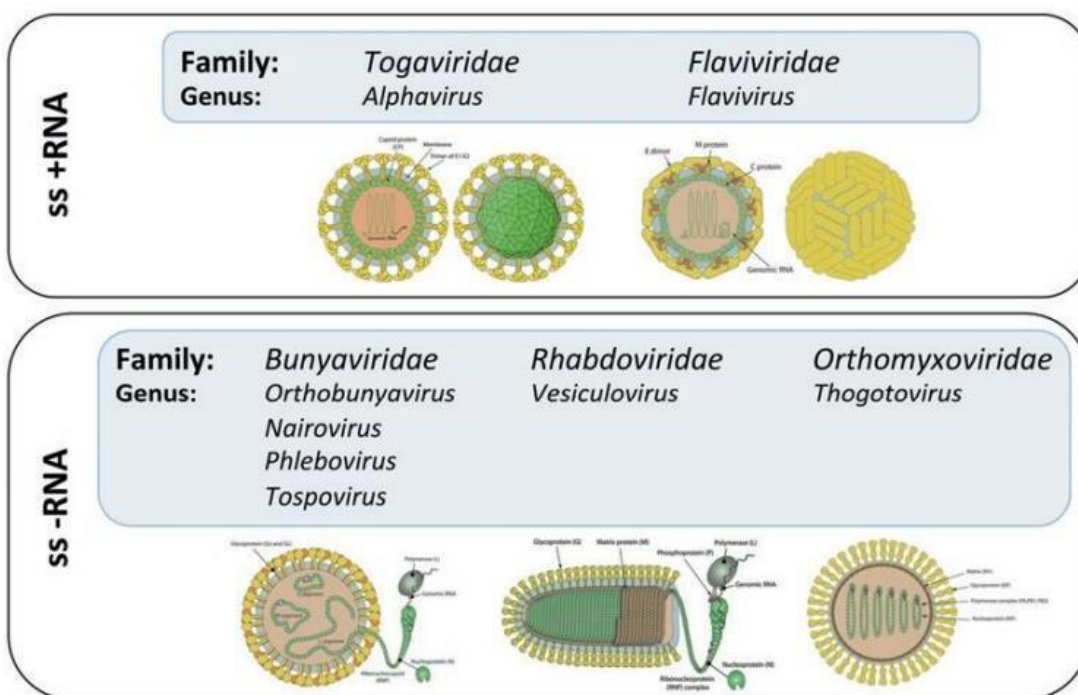


Figura 1. Principais famílias e gêneros representantes dos arbovírus. ss-RNA – RNA fita simples negativa; ss+RNA – RNA fita simples positiva (adaptado de Young, 2018).

Os flavivírus possuem um tamanho genômico de aproximadamente 11 kb e sua partícula mede em média 40 a 60 nm de diâmetro. Seu capsídeo proteico é envolvido por um envelope lipoproteico com espículas glicoproteicas. Todos são similares em sua estrutura e organização genômica. Possuem uma fase de leitura aberta (ORF – do inglês *open reading frame*) flanqueada por uma região cap-5'-terminal não codificante e uma região 3'-terminal não codificante, que formam uma estrutura do tipo “*stem-loop*” essencial para a replicação e transcrição. Essa estrutura expressa um polipeptídeo precursor de aproximadamente 3500 aminoácidos, clivado posteriormente em dez peptídeos, sendo eles: três proteínas estruturais – do capsídeo, do precursor de membrana (prM), e das glicoproteínas do envelope (E) – e sete não estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 – essenciais para o ciclo viral (Figura 2). O precursor de membrana é posteriormente clivado por uma protease furina permitindo a maturação da partícula infectiva (Campos *et al.*, 2018; Lidenbach & Rice, 2003; Young, 2018).

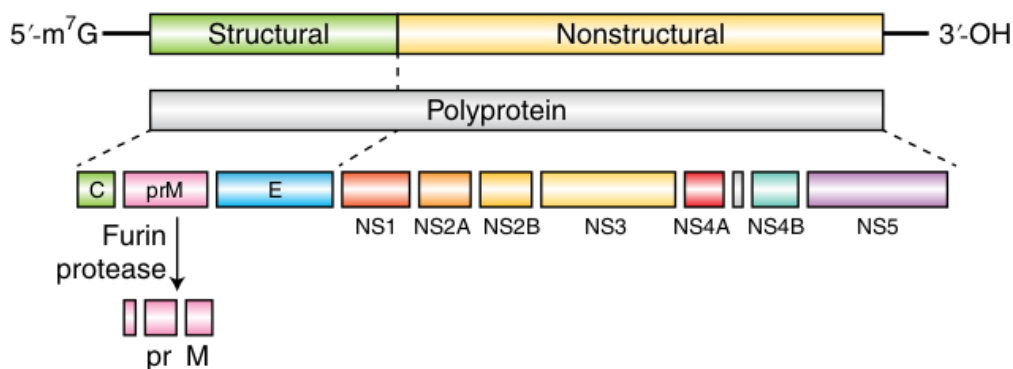


Figura 2. Organização genômica dos flavivírus e suas proteínas estruturais e não estruturais resultantes (adaptado de Campos *et al.*, 2018). O ciclo infectivo dos flavivírus nas células hospedeiras envolve quatro principais etapas: (I) adesão e endocitose da partícula viral, (II) liberação do nucleocapsídeo no citosol, (III) replicação, tradução e processamento do genoma e (IV) montagem e maturação e liberação de

novos vírions, representadas na Figura 3.

A etapa de adesão inicia a partir da ligação das partículas virais, opsonizadas ou não, a receptores de membrana. Esta ligação medeia sinalizações secundárias que engolfam o flavivírus em um endossomo, cuja acidificação desencadeia a reorientação dos dímeros de glicoproteína E de maneira a fundir as membranas do endossomo e do vírion, ocasionando a inserção do nucleocapsídeo no citosol. O material genético é então liberado, replicado e traduzido. Novos nucleocapsídeos são então formados, e a montagem ocorre a partir da ligação e brotamento pelo lúmen do retículo endoplasmático. Os vírus imaturos seguem pelo aparato de Golgi, cuja acidificação durante a trajetória estimula sua maturação. A liberação de novos vírions ocorre após a clivagem do prM por proteases do tipo furina nas porções pr e M, que continuam ligados à membrana juntamente com a glicoproteína E nos heterodímeros M_2E_2 . A etapa de adesão inicia a partir da ligação das partículas virais, opsonizadas ou não, a receptores de membrana. Esta ligação medeia sinalizações secundárias que engolfam o flavivírus em um endossomo, cuja acidificação desencadeia a reorientação dos dímeros de glicoproteína E de maneira a fundir as membranas do endossomo e do vírion, ocasionando a inserção do nucleocapsídeo no citosol. O material genético é então liberado, replicado e traduzido. Novos nucleocapsídeos são então formados, e a montagem ocorre a partir da ligação e brotamento pelo lúmen do retículo endoplasmático. Os vírus imaturos seguem pelo aparato de Golgi, cuja acidificação durante a trajetória estimula sua maturação. A liberação de novos vírions ocorre após a clivagem do prM por proteases do tipo furina nas porções pr e M, que continuam ligados à membrana juntamente com a glicoproteína E nos heterodímeros M_2E_2 . Isso previne a ligação da partícula imatura à membrana da célula hospedeira. Após a liberação do vírus, a superfície se torna lisa conforme a porção pr se dissocia, permitindo a formação de um vírus maduro (Campos *et al.*, 2018).

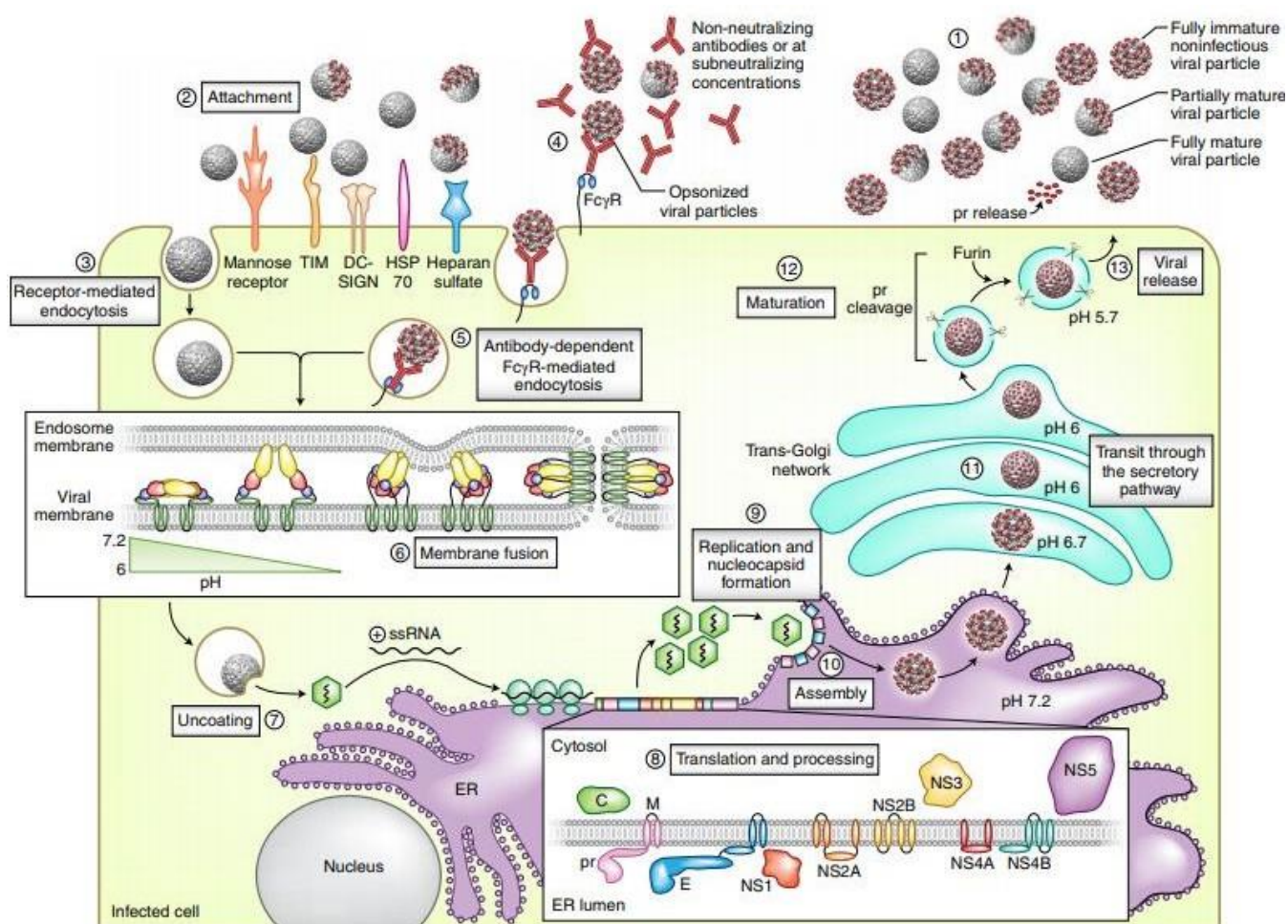


Figura 3. Ciclo infeccioso dos flavivírus. (I) adesão e endocitose da partícula viral por receptores de membrana, (II) liberação do nucleocapsídeo no citosol, (III) replicação, tradução e processamento do genoma e formação dos novos nucleocapsídeos e (IV) montagem e maturação e liberação de novos vírions (adaptado de Campos *et al.*, 2018).

Naturalmente, estas infecções incitam respostas pelo sistema imunológico hospedeiro de modo a iniciar a remoção destes agentes. As arboviroses mobilizam ambos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, além de estimular citocinas e a produção de anticorpos neutralizantes. Entretanto, de acordo com Campos e colaboradores (2018), a resposta à alta similaridade dos flavivírus pode atuar como uma “faca de dois gumes” na produção de anticorpos, de modo que estes podem agir de forma a proteger ou

exacerbar infecções secundárias em uma reação cruzada. Estes dados também sugerem que a reação imunológica depende da sequência de infecções primárias e seguintes e dos tipos virais que acometeram o hospedeiro.

Até o momento, não existe tratamento com antivirais específicos para as arboviroses, sendo indicado o rápido diagnóstico para acompanhamento do quadro clínico do paciente. O tratamento sintomático é indicado, sendo preconizado o alto consumo de líquidos e a redução do quadro febril por antipiréticos. Todavia, tal conduta é capaz de encobrir a evolução da doença. Quadros hemorrágicos, encefalopatias e outras complicações devem ser assistidas por meio de medidas específicas. Além disso, a notificação destas doenças é de caráter compulsório (Lopes et al., 2014; WHO, 2009).

Algumas vacinas já estão disponíveis para o acesso da população suscetível no Sistema Único de Saúde do Brasil, como é o caso da vacina para a febre amarela, e as medidas de combate aos vetores das doenças mais frequentes, como dengue, zika e chikungunha, são fortemente difundidas em campanhas por todo o país. Estas medidas incluem o uso de repelentes, inseticidas, limpeza e manutenção de focos de proliferação de mosquitos, e proteções em portas e janelas (Ministério da Saúde, 2019).

1.4 Vírus Rocio

O vírus Rocio é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Bem como outros componentes do gênero, possui RNA polaridade positiva fita única. É um vírus endêmico brasileiro que ficou conhecido por um surto de encefalite na costa do estado de São Paulo durante a década de 1970. Segundo o catálogo de arboviroses do CDC (*Centers for Disease Control*) é uma doença de ordem e morte significativa (de Souza Lopes et al., 1978).

O Vale do Ribeira é uma região costeira do estado de São Paulo e

engloba cerca de vinte municípios (Figura 4). Os moradores estão em constante contato com o ambiente silvestre, sendo a região reconhecida em 1990 pela UNESCO como Patrimônio Mundial da Humanidade por apresentar o maior remanescente da Mata Atlântica. Em 1974, teve início a primeira epidemia de encefalite do país, onde, no ano seguinte, cerca de 460 casos e 61 óbitos foram reportados no segundo trimestre. Nos dois anos seguintes, cerca de mil casos foram diagnosticados. Ainda, alguns autores sugerem que os surtos tenham ocorrido durante o período de 1973 a 1980, com aproximadamente mil casos da doença, ocasionando cerca de cem mortes e duzentos pacientes com sequelas (Ellwanger *et al.*, 2017; Figueiredo, 2000; Iversson, 1980; Lopes *et al.*, 1978).

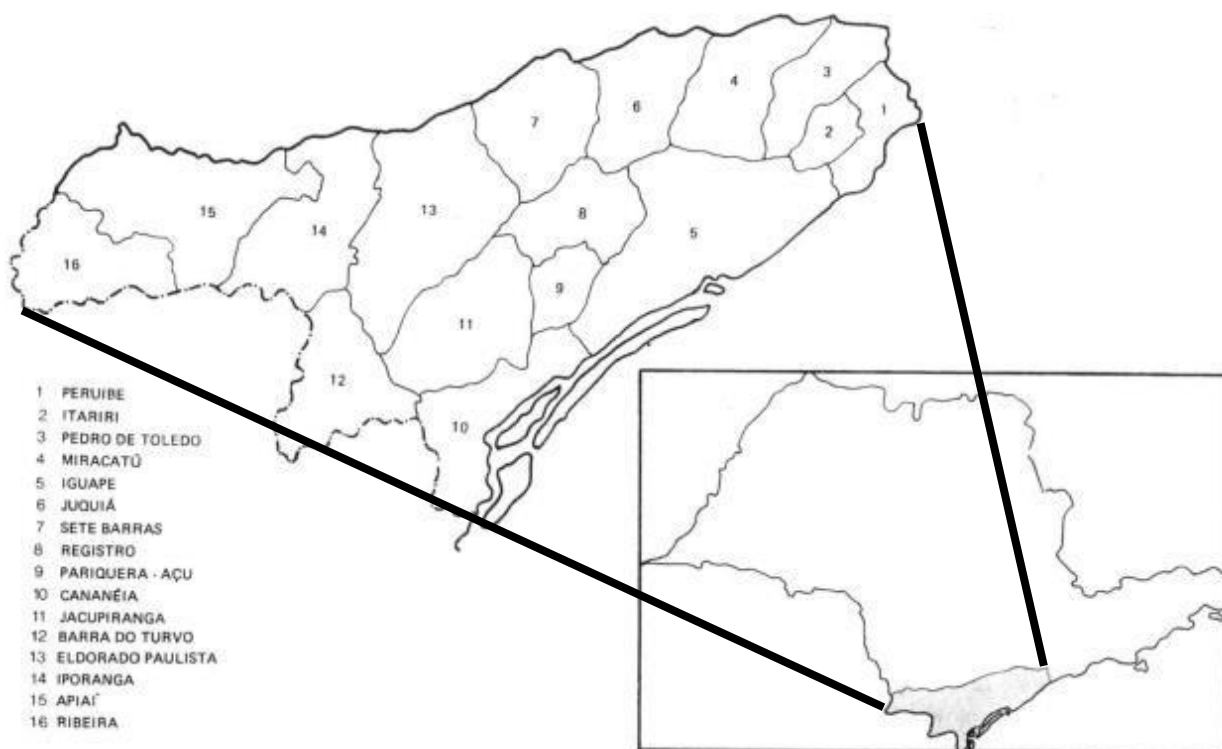


Figura 4. Região do Vale do Ribeira (SP) (adaptado de Iversson, 1980).

Ao final do ano de 1975, um trabalhador do município de Iguape foi admitido no hospital municipal apresentando febre alta, confusão, cefaleia e fraqueza nos membros inferiores, entrando em estado de coma algumas

horas depois. Três dias após ser admitido e transferido para um centro de referência, o paciente evoluiu para óbito por insuficiência respiratória. O sistema nervoso central e as vísceras deste paciente foram coletados para o exame *post-mortem*. Um vírus distinto de outros flavivírus foi isolado da medula e do encéfalo deste paciente, não tendo sido identificado nas vísceras coletadas (SPH 34675). Tecidos de outros dezoito pacientes com casos de meningoencefalite que evoluíram a óbito também foram coletados para análise, juntamente com amostras de soro de pacientes fatais e não fatais. Todas as análises de tecidos eram sorologicamente similares ao vírus identificado anteriormente, entretanto, nenhum vírus foi isolado do soro de pacientes com sintomas agudos da doença. Outras cepas foram identificadas em camundongos sentinelas e em um tico-tico (*Zonotrichia capensis*) amostrados da região, entretanto nenhum vetor foi identificado até o momento (Lopes *et al.*, 1978).

A primeira caracterização do vírus foi realizada pelos testes de inibição da hemaglutinação (HI) e fixação do complemento (CF), em comparação com outros arbovírus já conhecidos na região. As amostras demonstraram reação cruzada com outros flavivírus, como SLEV, JEV e MVEV, e em menor força com ILHV, BSQV e YFV, sugerindo seu pertencimento a este táxon. O vírus Rocio foi nomeado em homenagem ao bairro do município de Iguape onde o paciente residia, sendo identificado em 1978 como a segunda arbovirose mais importante, abaixo somente da febre amarela silvestre. Além disso, foi reconhecido como o único flavivírus causador de encefalite na América do Sul na época (Lopes *et al.*, 1978).

Estudos mais tardios sugerem que o vírus seja transmitido por mosquitos hematófagos das espécies *Psorophora ferox* e *Aedes scapularis*. Ainda, alguns autores especulam sobre suscetibilidade de mosquitos do gênero *Culex* a este vírus. Estes artrópodes são conhecidos por ocorrerem na região do surto e outras regiões do país, como os estados de Goiás e do Rio Grande do Sul, tornando estes estados suscetíveis a novos casos. Nenhuma evidência sugere que ocorra transmissão interpessoal, visto que nas residências habitadas por pacientes afetados

pela encefalite, cerca de 75% dos acometidos residiam em moradias diferentes. Este é um dado importante, sugerindo que o vírus seja incapaz de manter ciclos longos de epidemia (Lopes *et al.*, 1978; Lopes *et al.*, 1981; Mitchell *et al.*, 1986).

Os sintomas desta arbovirose incluem: distensão abdominal, cefaleia, febre, complicações respiratórias, mal-estar, retenção urinária, vômito, letargia, hiperemia da orofaringe e conjuntiva e sintomas neurológicos relacionados à encefalite, como cegueira, confusão, convulsões, surdez, disartria, meningite e anormalidades motoras e reflexas. Cerca de 20% dos acometidos pela doença nos anos 1970 desenvolveram sequelas, tais como distúrbios visuais, auditivos e olfatórios, estrabismo, disfagia, disartria, distúrbios de memória, motricidade e equilíbrio, parestesia e incontinência de esfíncter. A maioria dos casos afetados foram reportados em homens jovens com atividades rurais e crianças, com mortalidade de aproximadamente 13%. Por se tratar de um vírus neurotrópico, a característica das lesões são de infiltrados de células microgliais, necrose focal e neurodegeneração, principalmente na medula espinal, tronco cerebral, núcleo dentado, tálamo e hipotálamo. Ainda, estudos em camundongos sugerem um acometimento no miocárdico e pâncreas durante a infecção (CDC, 1984; Ellwanger *et al.*, 2017; Harisson *et al.*, 1989; Romano-Lieber & Iversson, 2000).

Em estudo desenvolvido por de Barros e colaboradores (2011), após a inoculação do vírus em camundongos, observou-se sua letalidade após atravessar a barreira hematoencefálica em menos de 24h. Os animais desenvolveram meningoencefalomielite fatal de 4 a 9 dias. Além disso, sugere-se o envolvimento de diversas células inflamatórias, linfócitos-NK e T CD8⁺, juntamente com diversas citocinas, como interferon gama e IL 4 e 10, que desempenham um papel de homeostase inflamatória. Os resultados também demonstraram severa lesão tecidual, degeneração e morte neuronal, principalmente no hipocampo e no giro dentado.

Embora o surto tenha sido limitado à região do Vale do Ribeira, ainda houve a detecção de anticorpos contra o ROCV. Tavares-neto e

colaboradores (1986) e Straatmann e colegas (1997), observaram anticorpos para o vírus em moradores da Bahia. Alguns anos depois, foram detectados anticorpos em equinos dos estados do Mato Grosso do Sul, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo, além de búfalos-d'água (*Bubalus bubalis*) no estado do Pará. Além disso, foram encontrados traços de genoma viral em mosquitos coletados na Floresta Nacional de Caxiuanã, no Pará, juntamente com a detecção de anticorpos em animais silvestres e anticorpos do tipo IgM na população humana da região. Apesar dos achados sugerirem a circulação do vírus pelo território brasileiro após o surto na baixada paulista, as reações cruzadas devido à alta similaridade de antígenos dos flavivírus, em especial do ILHV, não podem ser descartadas. Isto demonstra a necessidade de uma detecção acurada para as particularidades das arboviroses que podem levar a diagnósticos precipitados (Casseb *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Silva, 2018).

A reação cruzada entre outros arbovírus também pode ser observada com o vírus Rocio. Amarilla e colegas (2018) demonstraram uma proteção cruzada contra o ROCV em camundongos imunizados por infecções prévias por ILHV e SLEV. Os animais imunizados somente com uma infecção prévia pelo vírus Ilhéus demonstraram proteção completa a uma dose letal de vírus Rocio. No caso do SLEV, houve uma redução da mortalidade. Entretanto, outros arbovírus (DENV 1-4, BSQV, CPCV e ZIKV) não demonstraram proteção ou aumento da infecção. Em contrapartida, a exposição ao ROCV após uma infecção por YFV resultou em um aumento significativo da mortalidade.

O aprimoramento dependente de anticorpo (ADE – do inglês *antibody-dependent enhancement*) do ROCV também foi demonstrado em estudo desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2019). Enquanto as amostras de soro positivas para ZIKV demonstraram atividade neutralizante para Rocio, amostras de soro contendo anticorpos anti-DENV IgG e infecção ativa por ZIKV demonstraram aumento de infecção em linhagem celular. Estas reações cruzadas podem ocorrer devido à alta similaridade antigênica entre as sequências de aminoácidos da proteína E

entre os flavivírus, resultando tanto em um fator protetor quanto em aumento de severidade em infecções posteriores (Amarilla *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2018).

Na década de 1980, Lopes e colegas avaliaram a conversão sorológica após a produção de uma vacina combinada com ROCV e SLEV. Entretanto, a imunização não se mostrou efetiva, demonstrando uma taxa de conversão de cerca de 22%, com uma elevação significativa em 10% destes.

1.4.1 Aspectos moleculares do vírus Rocio

A caracterização do genoma completo do vírus Rocio foi publicada somente em 2007 por Medeiros e colaboradores. Neste estudo, o tamanho do genoma deste arbovírus foi determinado em 10.794 nucleotídeos, com uma ORF que compreende 10.275 nucleotídeos.

Esta região codifica uma poliproteína de 3.425 aminoácidos, que, após processos de edição e clivagem, origina dez proteínas comuns dos flavivírus. Estas proteínas são divididas em dois grupos: proteínas estruturais (pré-membrana, envelope e capsídeo – prM, E e C) e não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Estima-se que a variabilidade do tamanho genômico do vírus Rocio seja maior comparada ao DENV e seus subtipos e vírus transmitidos por carrapatos, do que aos demais membros do grupo (JEV, WNV, SLEV e ILHV). É proposto que a diferença no tamanho do genoma dos flavivírus seja devido a uma maior heterogeneidade na região não codificante 3'-NCR, entretanto, esta variabilidade também pode ser encontrada nas regiões codificantes. (Medeiros *et al.*, 2007).

Os sítios de glicosilação são fundamentais para garantir estabilidade, solubilidade e correta conformação de proteínas. No tipo N de glicosilação, uma glicana é ligada a proteína pela asparagina, quando existe uma sequência Ans-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina. De acordo com o estudo, estima-se a presença de dois

potenciais sítios de N-glicosilação nos genes *prM*, um sítio nos genes *E* e quatro nos genes *NS1*. Estes sítios foram encontrados somente nos domínios hidrofílicos e possuem função desconhecida, sendo que alguns estudos sugerem sua importância durante o ciclo infectivo de outros vírus. Além disso, foram encontrados 6, 12 e 12 resíduos de cisteína nestes genes, respectivamente, podendo indicar similaridade com outras cepas de vírus da mesma família (Beasley *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2007; York *et al.*, 2018).

O ROCV apresenta diversos peptídeos conservados entre os flavivírus. Alguns deles são compartilhados pela grande maioria dos arbovírus, sendo apenas um aminoácido a ser substituído quando comparamos as doenças transmitidas por mosquitos e as relacionadas as carrapatos (Medeiros *et al.*, 2007).

Em relação à ORF de outros flavivírus, o ROCV apresenta maior identidade com o ILHV (77,5%) e, em menor grau, a outros membros do grupo JEV (SLEV, WNV, MVEV e JEV). Grande parte dos estudos de análise filogenética relaciona o vírus Rocio a membros deste grupo, em especial ao vírus Ilhéus, podendo ainda ser associado aos subclados relacionados aos vírus causadores de encefalites e dos vírus transmitidos pelo gênero *Culex*, mas ainda assim sendo distinto. Atualmente, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV), o vírus Rocio está agrupado dentro do complexo Ntaya vírus, juntamente com o vírus Ilhéus (Fig. 5) (Medeiros *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 2017; Simmonds, 2017; Kuno *et al.*, 1998).

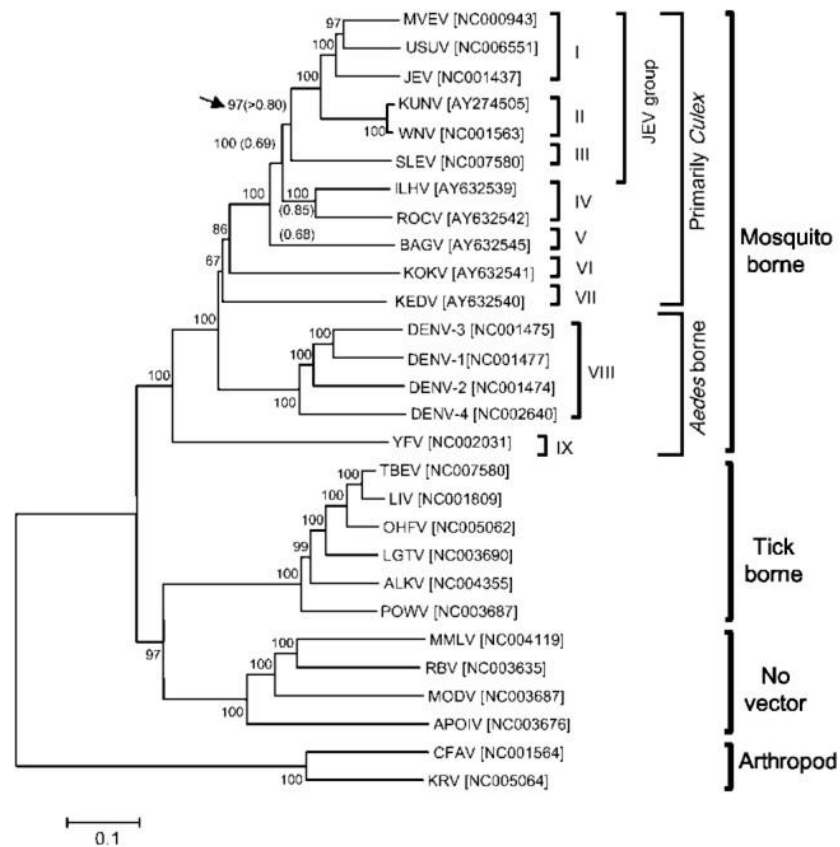


Figura 5. Filogenia dos arbovírus (adaptado de Medeiros *et al.*, 2007).

O genoma dos flavivírus é conhecido por possuir sequências complementares nos terminais do RNA que permitem sua associação resultando em uma ciclização da molécula, sendo essencial para a amplificação do material genético. Medeiros e colegas (2007) demonstraram que o ROCV possui um padrão similar a outros flavivírus. A presença de um pentanucleotídeo CACAG na estrutura de grampo de cabelo próxima a sequência 3'-terminal é de extrema importância para a replicação dos flavivírus, entretanto, a principal diferença se encontra principalmente na organização das sequências (CS3, RCS, CS2 e CS1) presente em outros arranjos em diferentes vírus. A formação destas estruturas secundárias na fita de RNA permite uma maior estabilidade com níveis diferentes de enovelamento (Villordo & Gamarnik, 2009).

Em 2017, Setoh e colaboradores realizaram uma nova análise do

genoma do ROCV, sugerindo algumas modificações da sequência protótipo. Dentre estas modificações, incluem-se a mudança de trinta nucleotídeos resultando em 14 mudanças de aminoácidos, encontradas nos genes *prM*, *E*, *NS3* e *NS5*. Este genoma atualizado demonstrou maior similaridade a outros flavivírus neurovirulentos.

A utilização de técnicas para apurar as características do genoma destes micro-organismos emergentes e a predição de suas estruturas permitem uma maior acurácia e rapidez diagnóstica, juntamente de uma maior eficácia no tratamento destas infecções.

1.5 Reposicionamento de fármacos – uma estratégia racional para o tratamento de infecções emergentes

Desde o descobrimento da penicilina no século passado, a busca pela prevenção e tratamento de doenças infecciosas se tornou foco principal da saúde pública global. O aumento nos últimos anos de micro-organismos resistentes está sendo reportado de maneira alarmante. Em contrapartida, o desenvolvimento de medicamentos e vacinas capazes de manejar tais afecções é dispendioso e vagaroso, tanto no âmbito da pesquisa básica até o desenvolvimento pela indústria farmacêutica. Além disso, as alternativas para a descoberta de moléculas antimicrobianas está se tornando cada vez mais escassa (Hughes & Karlen, 2014; Bassetti et al., 2017).

Tratando-se de doenças infecciosas potencialmente emergentes, se torna essencial a busca por alternativas que auxiliem de maneira rápida e eficaz no tratamento e que não tenham grandes custos para a saúde pública. Deste modo, o reposicionamento de fármacos pode ser uma estratégia interessante, pois permite o reaproveitamento de drogas já aprovadas pelas instituições para testes em modelos *in silico*, *in vitro*, *in vivo* e em estudos clínicos para diferentes alvos para as quais foram projetadas. Este é um fator importante, visto que dois terços das drogas em investigação não passam pela aprovação por estudos clínicos, seja

pela toxicidade ou falta de eficácia (Farha & Brown, 2018; Petrova, 2014; Zheng *et al.*, 2018).

Interessantemente, em análise conduzida por Zheng e colaboradores (2018), de aproximadamente 1500 fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, cerca de 20% possuem potencial anti-infeccioso, com maior atenção para as atividades antibacterianas e antivirais. Para isso, a triagem virtual e a interação destas moléculas com proteínas são estratégias essenciais na busca por possíveis alvos e drogas a serem reaproveitadas. Em estudo, Kharkar e colaboradores (2016) demonstraram o reposicionamento de fármacos aprovados e existentes com potenciais atividades anti-Ebola. Dentre estes fármacos estão antihipertensivos, antibióticos, antivirais e anti-inflamatórios. Após a triagem virtual, testes *in vitro* e *in vivo* são indispensáveis, como no caso da clorciclizina, um antihistamínico que foi avaliado para o tratamento da hepatite C crônica por um estudo clínico que permitirá o melhoramento desta droga para uma maior segurança e estabilidade (Koh *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

Levando em consideração:

- (i) a forte presença de fatores fundamentais para a emergência e re-emergência de infecções relacionadas a arbovírus no Brasil;
- (ii) a necessidade de implementação de medidas de prevenção, tratamento e controle para estas arbovirose;
- (iii) os indícios da circulação do vírus Rocio pelo território brasileiro e sua relevância dentro de um contexto de saúde pública;

Se torna necessária a investigação das estruturas virais do vírus Rocio, de modo a sugerir seu papel de envolvimento no ciclo replicativo e a auxiliar na elaboração de tratamentos seguros e efetivos.

3. OBJETIVOS

O presente estudo possui como objetivo geral realizar, a partir de análise computacional, o reposicionamento de fármacos para o combate das infecções relacionadas ao vírus Rocio, de modo a:

- a. elucidar a estrutura das proteínas estruturais e não estruturais do vírus Rocio;
- b. determinar o(s) possível(is) alvo(s) molecular(es) e analisar virtualmente a interação de fármacos já disponíveis nas bases de dados integrando o mercado e o Sistema Único de Saúde brasileiro;
- c. identificar os possíveis candidatos frente ao tratamento deste arbovírus.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo submetido à revista *Antiviral Research* (IF 5.970)

Endereço eletrônico - <https://www.journals.elsevier.com/antiviral-research>

Rocio virus encephalitis: In silico evidence for drug repurposing

João Pedro Nunes Sagini^a, Rodrigo Ligabue-Braun^{ab*}

^a Graduate Program in Biological Sciences (PPGBio), Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Sarmiento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, Brazil. E-mail address: pedrosagini@gmail.com

^b Department of Pharmacosciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Sarmiento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

* Corresponding author.

E-mail address: rodrigolb@ufcspa.edu.br

Abstract

Arboviral diseases have high incidence in Brazil and constitute a serious public health problem. Rocio virus (ROCV) is an arbovirus belonging to the family *Flaviviridae* responsible for the emergence of an outbreak of encephalitis on the São Paulo state coast in the late 1970s. Although no recent case of this virus has been reported, data suggest the circulation of ROCV throughout the Brazilian territory. Given these indications and the strong presence of fundamental factors for the resurgence of emerging diseases in Brazil, this work aims to obtain, from virtual screenings, possible targets and therapeutic molecules redirected to fight infections related to ROCV. Here, we demonstrated that the *National List of Essential Medicines of Brazilian Unified Health System (SUS)* has several molecules that could be redirected to combat this flavivirus, as simeprevir, daclatasvir, iloprost, and itraconazole. Among them, itraconazole showed to be an interesting candidate since it interacts with both structural and non-structural proteins of this virus.

Keywords:

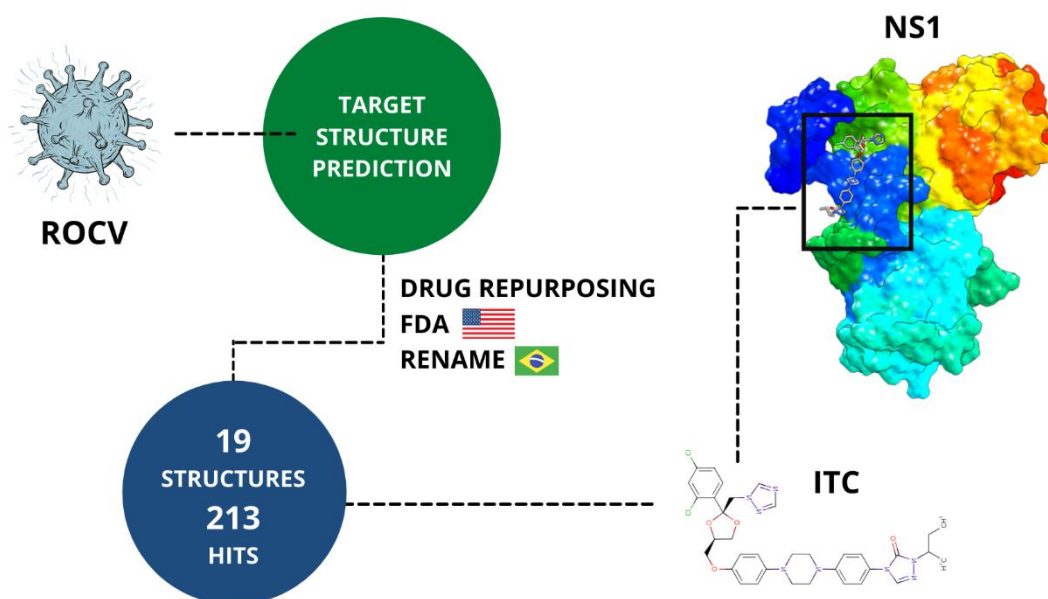
Drug repurposing
Emergent infection
Molecular docking
Rocio Virus
NSI

Abbreviations:

Rocio virus (ROCV)
National List of Essential Medicines (RENAME)
Envelope protein (E)
Capsid protein (C)
Non-structural protein 1 (NS1)
Nos-structural protein 5 (NS5)
Itraconazole (ITC)
Daclatasvir (DAC)

Highlights:

- Rocio virus is a potentially reemergent infectious agent that causes encephalitis.
- RENAME is a repository of freely available drugs in the Brazilian Health System.
- Therapeutics available at RENAME have an optimistic perspective for repurposing.
- Itraconazole interacts with ROCV non-structural proteins, especially NS1 and NS5.
- Itraconazole could act as a replication inhibitor in ROCV infection.

Graphical abstract

1. Introduction

Arboviruses (arthropod-borne viruses) have become a global public health threat due to disordered urbanization, deforestation, garbage accumulation, and environmental changes [1]. Although dengue virus (DENV) is the most relevant arbovirus in Brazil, followed by yellow fever (YFV), zika (ZIKV), and chikungunya viruses (CHIKV), other pathogens have an emerging and reemerging epidemic potential, such as Ilheus virus (ILHV), Oropouche virus (OROV) and the Rocio virus (ROCV) [2].

ROCV is a flavivirus that was known to be responsible for the appearance of an outbreak of encephalitis on the coast of Brazil in the mid-1970s. It was recognized as the only encephalitis-causing flavivirus in South America in the 1970s and the second most important arbovirus at the time, second only to wild yellow fever. Its name was based in Iguape county's district in which it was first discovered in the Ribeira Valley, São Paulo [3,4]. Some authors suggest that the outbreaks occurred during the period from 1973 to 1980, with approximately one thousand cases of the disease, causing about one hundred deaths and two hundred patients with sequelae of the disease [4, 5, 6, 7,]. Symptoms of this arbovirosis include non-specific signs, such as bloating, headache, fever, respiratory complications, malaise, vomiting, lethargy, oropharyngeal and conjunctiva hyperemia, and neurological symptoms related to encephalitis, such as blindness, confusion, seizures, deafness, dysarthria, meningitis, and motor and reflex abnormalities. About 20% of those affected by the disease developed sequelae, such as senses dysfunctions, dysphagia, dysarthria, memory, motor and balance disorders, and paresthesia [5, 8].

The molecular characterization of the ROCV indicates that its genome is ~ 10.8Kb in size, with an ORF comprising 10275 nucleotides. This region encodes a 3425 amino acid polyprotein, which, after editing and cleavage processes, gives rise to ten common flavivirus proteins. These proteins are divided into two groups: structural proteins (pre-membrane, envelope, and capsid - prM, E, and C) and non-structural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5). Regarding the ORF of other flaviviruses, ROCV has a greater identity with ILHV (77.5%) and, to a lesser extent, with other members of the Japanese encephalitis virus group (SLEV, WNV, MVEV, and JEV) [9].

Vector studies suggest that the virus is transmitted by blood-sucking mosquitoes of the species *Psorophora ferox* and *Aedes scapularis*. Still, some authors speculate about the susceptibility of mosquitoes of the genus *Culex* to this virus. These arthropods are known to inhabit the outbreak region and other regions Brazil, such as the states of Goiás and Rio Grande do Sul, making these states susceptible to new cases. There is no evidence to suggest that interpersonal transmission occurs, since approximately 75% of those patients affected by encephalitis lived in different households. This is an important finding, suggesting that the virus may be unable to sustain long epidemic cycles [4, 10, 11]. Although this epidemic has been limited to the Vale do Ribeira region, studies suggest the circulation of the virus throughout the country. Saivish and colleagues [12] detected viral ROCV RNA in 2 of 121 patients with a negative dengue diagnosis from a fever outbreak between 2011 and 2013. Therefore, it is estimated that many of the cases are underreported, given their similarity with other arboviruses, reinforcing the need to search for accurate diagnoses [13, 14, 15].

At the moment, there is no specific antiviral treatment for arboviruses, and a rapid diagnosis is recommended to monitor the patient's clinical condition. Symptomatic treatment is indicated, with high consumption of fluids and a reduction in febrile symptoms by antipyretics. However, self-medication could cover the evolution of the disease. Hemorrhagic conditions, encephalopathies and other complications must be assisted by specific conducts [16].

While considering potentially (re)emerging infectious diseases, it is essential to search for alternatives that may aid quickly and effectively in the treatment and do not have significant public health costs. Thus, the repurposing of drugs can be an attractive strategy, as it allows the reuse of drugs already approved by institutions for testing *in silico/vitro/vivo* models and in clinical studies for different targets for which they were designed. This repositioning is a relevant factor since two-thirds of the drugs under investigation do not pass approval by clinical studies, either due to toxicity or lack of effectiveness [17, 18, 19].

Bearing in mind the strong presence of fundamental factors for the emergence and re-emergence of infections related to arboviruses in Brazil, and the need to implement prevention, treatment, and control practices for those pathogens, we investigated the repurposing of drugs to fight infections related to ROCV, based on computational elucidation of its proteins.

2. Material and Methods

2.1 Obtaining the genomic sequence

The genomic sequence of the Rocio virus was obtained from the NCBI Viral Genomes Resource [20], under access code NC_040776.1 [21]. The coding regions were identified based on the most recent annotation of the genome and their virtual translation was used to obtain three-dimensional structures for all viral proteins.

2.2. Protein structure prediction

Possible template structures were identified by similarity of amino acid sequence by BLAST search [22] in the RCSB Protein Data Bank [23] with structural modeling of proteins being performed using the I-TASSER pipeline [24]. The C-Score and the TM-Score were analyzed to assess the confidence value, quality, and similarity of models. Still, the generated models were validated for permitted distribution of residues by Ramachandran plot. Additional model evaluation was performed with SwissModel tools [25].

2.3 Potential targets selection and drug virtual screening

Proteins with the potential for "druggability", i.e. to be inhibited to the point of weakening or hampering the viral cycle, were selected based on the literature available for taxonomically close viruses, while the identity degree between viral and human proteins was considered for potential off-target effects. The identification of inhibitor candidates for the target proteins was performed by virtual screening [26, 27], using the ZINC database of molecular structures [28] and the molecular docking server DockThor [29]. The selected subset contained only molecules approved by the Food and Drug Administration (FDA) and consisted of 1657 molecules, being additionally filtered only for drugs available in the National List of Essential Medicines (RENAME) of Brazilian Unified Health System (SUS), one of the widest public health care systems in the world [30]. DockThor dedicated virtual screening tools were employed for the docking calculations. Each previously modeled structure was paired with the selected subset, using standard parameters for the primary blind virtual screening. For proteins with more than one domain, docking was performed for separate domains and complete structures.

Each protein's top 50 results were evaluated and explored according to their presence at RENAME. We subsequently analyzed the best score results according to their frequency and pharmacological characteristics. A refined docking was performed using proteins that demonstrated interaction with the sorted molecules, using the following parameters: grid box edges measuring 8Å x 18Å x 15Å, with a discretization of 0.25Å, standard search algorithm, with resulting conformers being clustered at 2Å of RMSD. Drug-target interactions were inspected via PLIP [31] and LigPlot+ [32]. All visualizations and molecular manipulations were performed with UCSF Chimera [33].

3. Results and discussion

3.1 ROCV structural and non-structural proteins modeling

Like other flaviviruses, genomic polyprotein results in mature proteins after specific enzymatic cleavages in the host cell's endoplasmic reticulum (ER) [34]. Based on the ROCV polyprotein amino acid sequence, which contains 3425 residues and 16 coding regions, we obtained 11 prototypes representing structural and non-structural proteins of the virus. Still, the individualized domains belonging to three of these proteins (protein E of the envelope, NS3, and NS5) were elucidated separately (Box A.1). The modeling results are described in Table 1 and were used to perform the virtual screening.

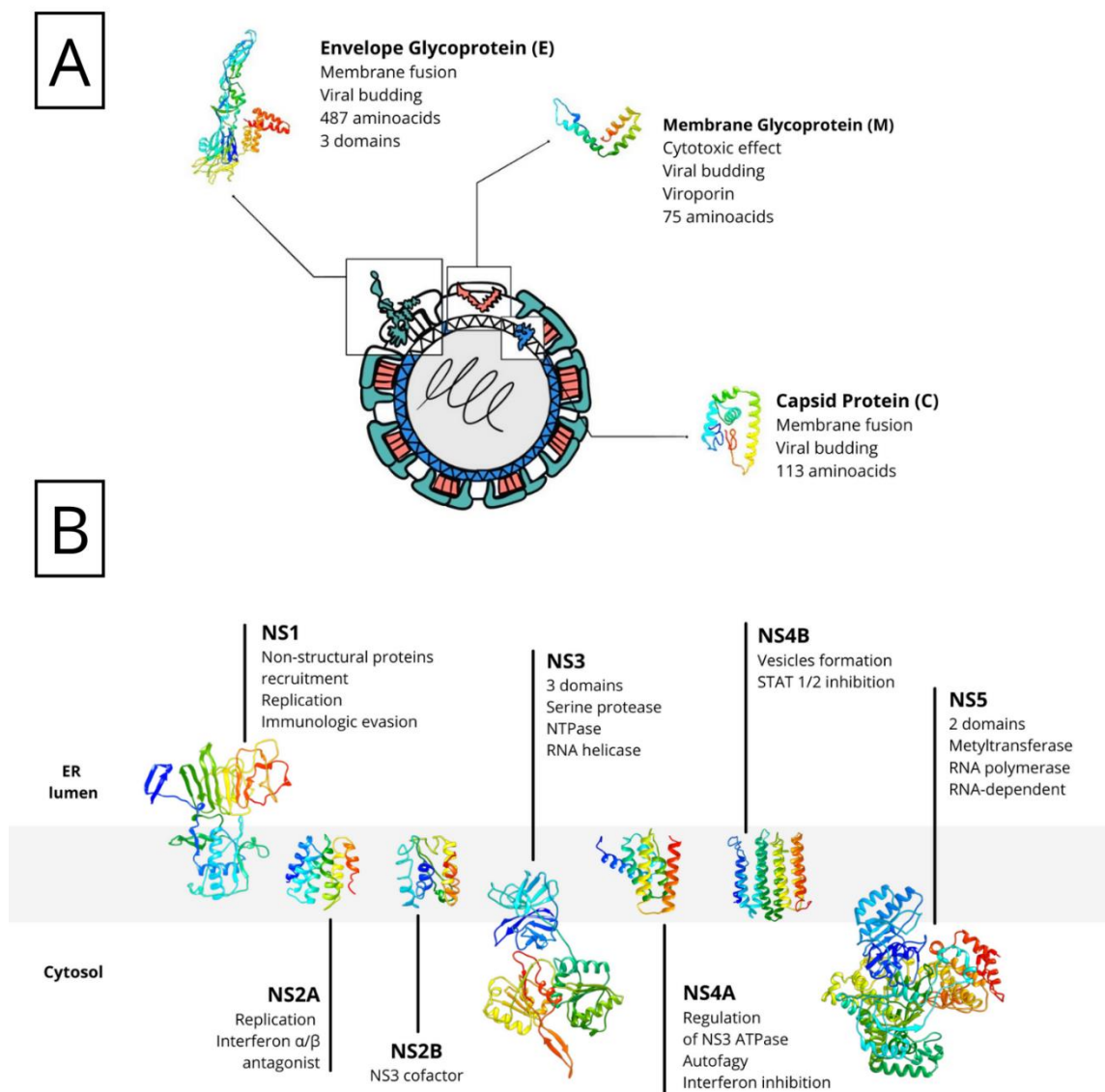


Figure 1. Schematic representation of ROCV proteins. The genome polyprotein is cleaved after translation into two types of proteins: structural proteins (A), present in the viral particle and responsible for viral assembly, evasion, and invasion; and non-structural proteins (B), present mainly in the endoplasmic reticulum (ER) and needed for the production of new virions.

There are three structural proteins: capsid protein (C), envelope protein (E), and membrane protein (M), which is cleaved from the PrM propeptide after its translation (Fig 1.A). These proteins have a binding function to the host cell, inducing the viral genome penetration into the cytoplasm after its partial fusion, as well as assisting in the assembly, budding, and maturation of the new viral particles. Non-structural proteins (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, and NS5) are present mainly in the ER and play the central role in viral replication (Fig 1.B) [35].

The amino acid sequence comparison was able to identify similar proteins in the PDB database and evaluate their similarity with other flaviviruses (data not shown). This step proved to be essential since the ROCV protein structures are not resolved and incorporated in any database. Only three proteins had no matches in this search: non-structural protein 2A (NS2A) and non-structural proteins 4A and 4B (NS4A/NS4B), which could justify lower quality models compared to those that have at least partial direct templates.

Table 1. Parameters from structural elucidation of ROCV proteins.

Structure	Size	I-TASSER		Ramachandran Plot			
		C-Score	TM-Score	Residues in most favoured regions	Residues in additional allowed regions	Residues in generously allowed regions	Residues in disallowed regions
Capsid protein C	113	-1.30	0.55 ± 0.15	76%	16.7%	5.2%	2.1%
Polyprotein propeptide	56	0.55	0.79 ± 0.09	71%	24.6%	2.9%	1.4%
Glycoprotein M	75	0.12	0.73 ± 0.11	78.5%	16.9%	1.5%	3.1%
Envelope glycoprotein E – Central and Dimerization domains	297	1.25	0.89 ± 0.07	76.8%	18.8%	2.7%	1.5%
Envelope glycoprotein E – Ig-Like domain III	93	1.20	0.88 ± 0.07	82.4%	14.9%	1.4%	1.4%
Envelope glycoprotein E – Stem/anchor	97	0.88	0.83 ± 0.08	87.3%	7.6%	2.5%	2.5%
Envelope glycoprotein E – Complete structure	487	2.00	0.99 ± 0.04	77.1%	19.5%	1.7%	1.7%
NS1	355	1.76	0.96 ± 0.05	73.1%	23.1%	2.6%	1.3%
NS2A	132	-2.93	0.38 ± 0.13	63.1%	24.6%	6.6%	5.7%
NS2B	127	-3.55	0.32 ± 0.11	45.5%	42.7%	7.3%	4.5%
NS3 – S7 domain	149	1.48	0.92 ± 0.06	79.1%	19.1%	0.9%	0.9%
NS3 – DEAD domain	148	0.69	0.81 ± 0.09	77%	20.6%	0.8%	1.6%
NS3 – Helicase domain	145	0.83	0.83 ± 0.08	81.3%	17.9%	0.8%	-
NS3 – Complete structure	442	0.81	0.82 ± 0.08	77.8%	20.3%	0.5%	1.4%
NS4A	140	-2.43	0.43 ± 0.14	84.7%	10.5%	2.4%	2.4%
NS4B	247	-3.20	0.36 ± 0.12	76.7%	15.7%	5.7%	1.9%
NS5 – Fts-J like domain	168	1.27	0.89 ± 0.07	87%	10.1%	2.2%	0.7%
NS5 – RNA polymerase domain	645	2.00	0.99 ± 0.03	83.7%	14.1%	0.9%	1.4%
NS5 – Complete structure	813	2.00	0.99 ± 0.04	82%	15.3%	1.5%	1.1%

3.2 RENAME drugs have potential to become ROCV treatment precandidates

To investigate the "druggability" of selected targets, the subset covered only drugs deposited in the DrugBank approved by the FDA, containing 1657 molecules. This database was submitted to the DockThor platform along with the 19 previously modeled ROCV targets. During the blind virtual screening, 24 molecules considered structurally invalid by the platform were excluded, resulting in 1633 submitted molecules. At the end of the docking, the 50 molecules with the best scores for each of the targets were selected for further analysis, totaling 950 molecules.

RENAME comprises an improved and published list to guarantee access and pharmaceutical care within the scope of SUS. It includes traditional medicines, specialized drugs, supplies, and vaccines. A manual filtering of 950 molecules was performed according to the 2020 version to select drugs available at RENAME. This selection included drugs present in this version, with or without combined use, and the version exclusions. Of these 950 molecules, about 19.4% were present, 3% of which were excluded from the current version. It must be taken into account that the molecules present in the list may or may not repeat in the same or different dockings. Also, the atracurium/cisatracurium molecules, which are not present in the list, were between the most prevalent and best-scored molecules on the list (Table A.1).

The target with the highest scores and an interesting number of ligands available at RENAME was NS5. This protein has 813 amino acids and is located mainly in the nucleus of the host cell. However, it can be found in the membrane of the endoplasmic reticulum and budding vesicles. It can form homodimers and has post-translational modifications by phosphorylation of serine residues, which stimulates nuclear localization. In addition, it interacts with the NS3 protease [35].

Furthermore, NS5 is the most conserved protein in the flavivirus genome and has the function of replicating the viral genome and "capping" of the genomes in the cytoplasm, methylating guanine N-7 and ribose 2'-O. Also, it inhibits phosphorylation of STAT2 and TYK2, preventing JAK-STAT signaling and antiviral action of the cell. Two NS5 protein domains are known: a methyltransferase domain (MTase) in the N-terminal region and an RNA-dependent RNA polymerase domain in the C-terminal. It is also estimated that NS5 has interferon blocking and cytokine production activities [36]

Considering the other molecular targets, we observed the highest scores on protein E of the envelope, followed by non-structural proteins NS1, NS4B, and C. The most frequent molecules among the best scores were the antifungal agents itraconazole and ketoconazole (present in 15 of the 19 targets), the antivirals simeprevir and daclatasvir, and the antihypertensive iloprost. Also, we can highlight the antiretrovirals saquinavir and lopinavir.

In order to select the best molecules and targets for repositioning, we sought to evaluate the best scores within the selected RENAME molecules, their frequency and absence at docking, together with their dosage, toxicity, and use properties.

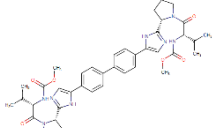
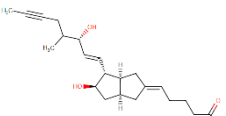
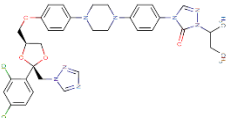
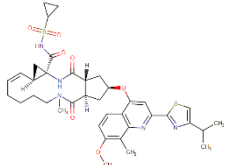
Four molecules were selected (simeprevir, daclatasvir, iloprost, and itraconazole) to evaluate and screen on the DrugBank database considering the various factors as use, dosage, contraindications, and molecular aspects (Table 2). In view of these characteristics, only the itraconazole (ITC) and daclatasvir

(DAC) were selected for further analysis of specific docking at the active protein site. The NS4A and glycoprotein M proteins were excluded from the analyzes as they did not obtain results for these drugs.

Interestingly, Montes-Grajales and colleagues [37] performed an *in silico* identification of potential molecules for repositioning and use in the treatment of dengue, zika, and chikungunya. Five molecules, including pranlukast, nilotinib, conivaptan, ITC, and novobiocin, were selected for *in vitro* analysis. Although demonstrating good affinity *in silico*, this antifungal did not show significant antiviral activity *in vitro*.

Other authors report the antiviral activity of itraconazole, however, most of these activities are related to respiratory viruses, such as rhinovirus, influenza A, and more currently, the SARS-Cov-2 virus, highlighting that the antiviral activity of this antifungal agent should be investigated further for the treatment of the flaviviruses [43, 44, 45].

Table 2. Particular aspects of pre-selected molecules the virtual screening.

Drug	Molecular weight (Da)	Group	Administration	Indication	Target	Adverse effects
Daclatasvir	 738.89	Antiviral	Oral	Hepatitis C	NS5A	Headache, fatigue, nausea, and diarrhea
Iloprost	 360.49	Antihypertensive	Inhaled Intravenous	Pulmonary arterial hypertension	Prostacyclin receptor	Neuropathy, nausea, headache, leukopenia, and cardiac effects
Itraconazole	 705.63	Antifungal	Oral Intravenous	Blastomycosis, histoplasmosis, aspergillosis, and onychomycosis	Cytochrome P450 14 α -demethylase	Thrombocytopenia, bronchospasm, nasal congestion, diarrhea, tachycardia, and hypotension
Simeprevir	 749.94	Antiviral	Oral	Hepatitis C	NS3/4A	Headache, fatigue, nausea, and diarrhea

3.3 ITC interacts with multiple ROCV targets

From the selection of ITC and DAC, we carried out new directed dockings with the target proteins using more refined analysis parameters. The flowchart of the selection of candidate drugs is described in Figure 2.

DAC is an agent capable of preventing viral replication during hepatitis C virus (HCV) infection by binding to NS5 [38]. Since HCV is a flavivirus, we could expect some similar interaction from this drug to ROCV proteins. On the other hand, ITC is a large triazole antifungal that inhibits the ergosterol synthesis pathway and is indicated for treating fungal infections such as aspergillosis [39].

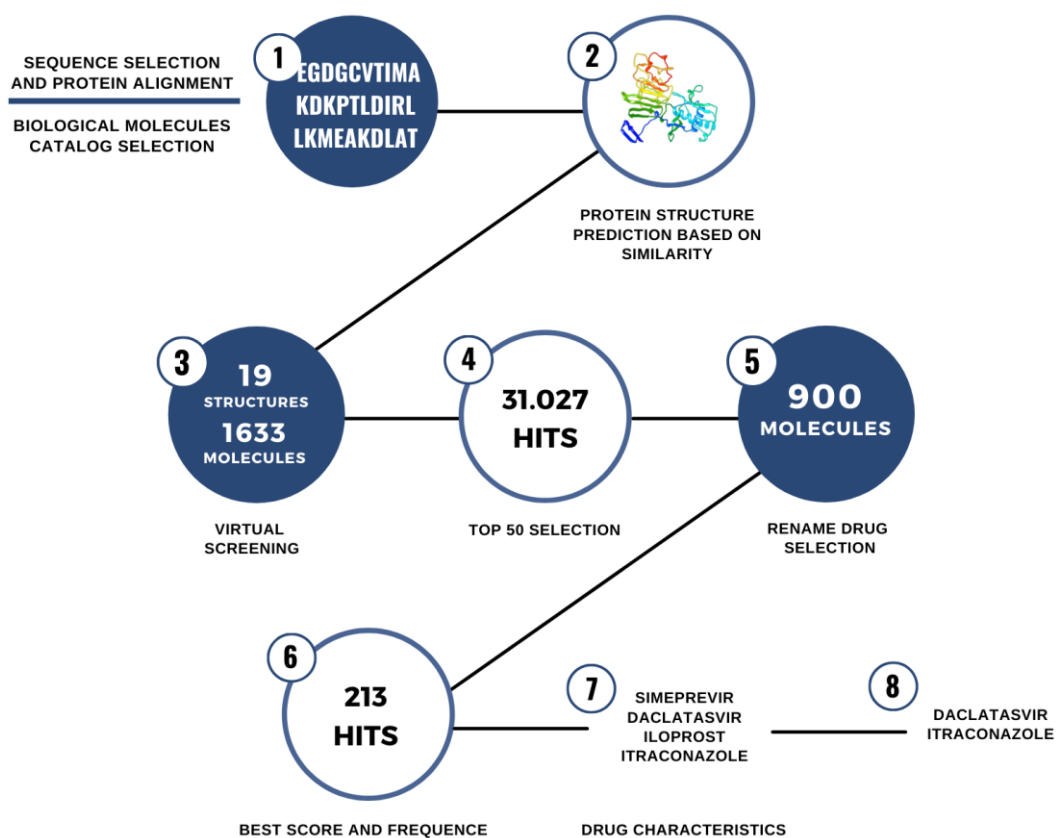


Figure 2. Steps for the identification of drug repurposing candidates against ROCV proteins.

Our further analyses demonstrated an improvement in interactions between ITC and the proteins C, propeptide, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4B, and NS5A, as shown in Figure 3. However, this same improvement was not obtained when applying the new parameters for DAC.

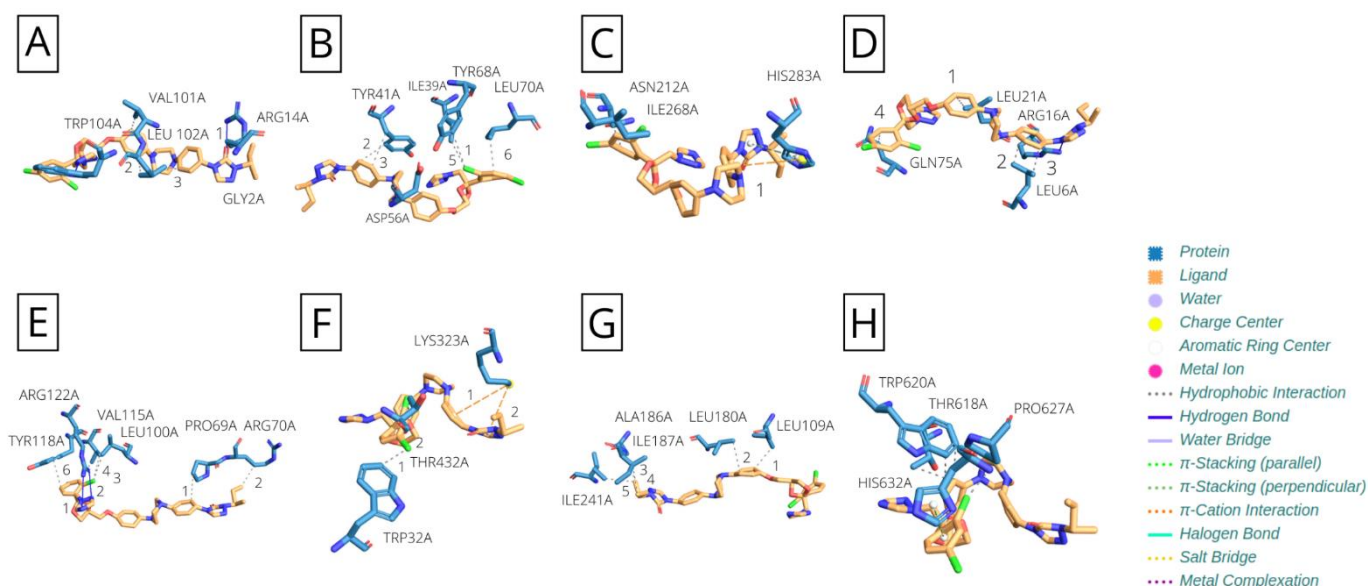


Figure 3. Itraconazole interaction with ROCV proteins. (A) Capsid protein; (B) polyprotein propeptide; (C) envelope glycoprotein; (D) NS2A; (E) NS2B; (F) NS3; (G) NS4B and (H) NS5.

The NS1 protein showed to be an interesting target for this drug, since it was the best scored candidate. This 355 amino acid protein is located in the endoplasmic reticulum, being secreted N-glycosylated in homohexameric form, and interacts with E protein and NS4B. Also, it interacts with host CFH complement protein leading to C3 degradation. It has three destinations after its cleavage: (i) replication cycle, where it is necessary for the formation of the replication complex and recruitment of other NS proteins in the ER membrane structures; (ii) plasma membrane; and (iii) extracellular compartment, being excreted in lipoparticles antagonizing complement function and aiding in the evasion of the immune system [35]. We highlight the ITC-NS1 interaction in Figure 4.

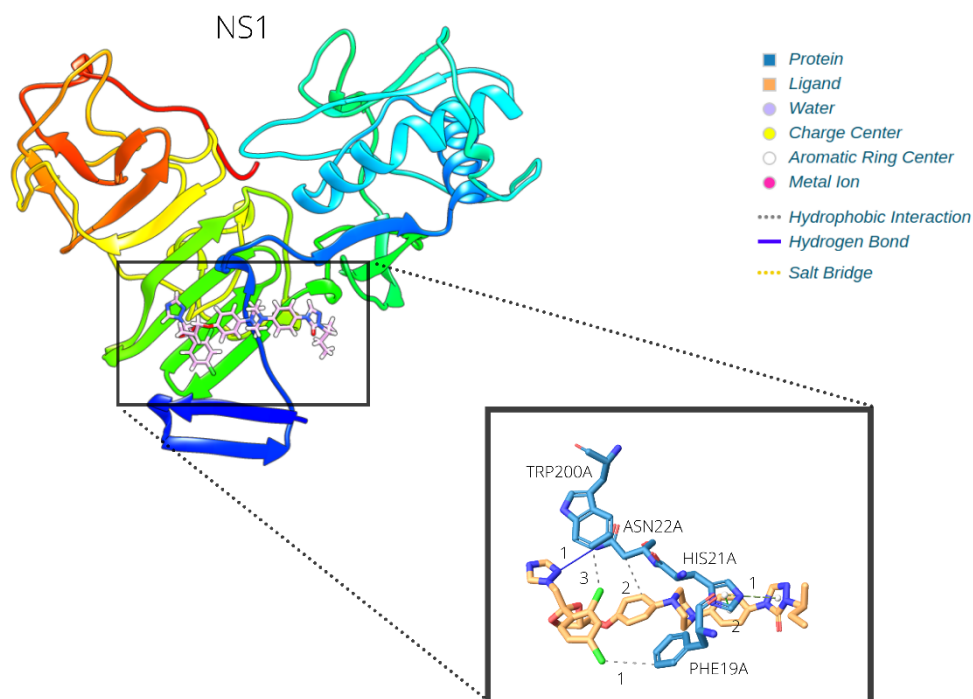


Figure 4. Itraconazole-NS1 interaction.

Several authors suggest the importance of this protein in different arboviral infections, which indicates that this could be an interesting target for therapeutics [40, 41, 42]. As previously reported [37], ITC has a virtual interaction with arboviral proteins. However, since it demonstrated no viral inhibition *in vitro* for ZIKV and DENV, its potential for treating rare emergent flavivirus remains unknown.

Here, we investigated the interaction of the FDA-approved drugs available at the non-cost public health care system in Brazil with an emergent flavivirus. We suggested that itraconazole could be an exciting candidate for rapid drug repurposing in case of a (re)emergency of ROCV infections in Brazil. This molecule demonstrated interactions with most of its proteins, especially with NS1, which may be an interesting multitarget drug.

Acknowledgements

The authors thank the DockThor team for the virtual screening server access granted for performing this work.

References

- [1] J.L. Duarte, F.A. Diaz-Quijano, A.C. Batista, L.L. Giatti. Climatic variables associated with dengue incidence in a city of the Western Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 52 (2019) e20180429. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0429-2018>
- [2] P.R. Young, *Arboviruses: A Family on the Move*. In: Hilgenfeld R., Vasudevan S. (Eds) *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1062. Springer, Singapore, 2018, pp. 1-10. doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_1
- [3] O. de Souza Lopes, T.L. Coimbra, L. de Abreu Sacchetta, C.H. Calisher. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. *Am J Epidemiol.* 107 (1978) 444-449. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112563>
- [4] O. de Souza Lopes, L. de Abreu Sacchetta, T.L. Coimbra, G.H. Pinto, C.M. Glasser. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. II. Epidemiologic studies on 1975 epidemic. *Am J Epidemiol.* 108 (1978) 394-401. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112637>
- [5] J.H. Ellwanger, V. L. Kaminski, J.A.B. Chies. Rocio virus: an overview. *Rev Peru Divulg Cient Génét Biol Mol.* 1 (2017) 14-20.
- [6] L.T Figueiredo. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2 (2000) 1643-1649. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01320-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01320-4)
- [7] L. B. Iversson. Aspects of the encephalitis epidemic caused by arbovirus in the Ribeira Valley, S. Paulo, Brazil, during 1975-1978. *Rev de Saúde Pública.* 14 (1980) 9-35. <https://doi.org/10.1590/S003r4-89101980000100002>
- [8] N.S. Romano-Lieber, L.B. Iversson, L. B. (2000). Serological survey on arbovirus infection in residents of ecological reserve. *Rev de Saúde Pública.* 34 (2000), 236-242. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000300005>
- [9] D.B.A Medeiros, M.R.T. Nunes, P.F.C Vasconcelos, G.J Chang, G. Kuno. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. *J Gen Virol.* 88 (2007) 2237-2246. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82883-0>
- [10] O. de Souza Lopes, L. de Abreu Sacchetta, D.B. Francy, W.L. Jakob, C.H. Calisher. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of Rocio virus from *Psorophora Ferox* (Humboldt, 1819). *Am J Epidemiol.* 113 (1981) 122-125. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113075>
- [11] J. C. Mitchell, O.P. Forattini, B.R. Miller (1986). Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. *Rev de Saúde Pública,* 20

- (1986) 171-177. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101986000300001>
- [12] M.V. Saivish, V.G. da Costa, R.L. Rodrigues, V.C.R. Féres, E. Montoya-Diaz, M.L. Moreli. Detection of Rocio Virus SPH 34675 during Dengue Epidemics, Brazil, 2011-2013. *Emerg Infect Dis.* 26(2020) 797-799. <https://doi.org/10.3201/2604.190487>
- [13] J. Tavares-Neto, A.P.A Travassos da Rosa, P.F.C. Vasconcelos, J.M.L. Costa, J.F.S. Travassos da Rosa, P.D. Marsden. (1986). Research of antibodies to arbovirus in the serum of residentes of the village of Corte de Pedra, Valença, Bahia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 81 (1986) 351-358. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101986000300001>
- [14] A. Straatmann, S. Santos-Torres, P.F.C. Vasconcelos, A.P.A. Travassos da Rosa, S.G. Rodrigues, J. Tavares-Neto (1997). Serological evidence of the circulation of the Rocio arbovirus (Flaviviridae) in Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop*, 30 (1997) 511-515. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000600012>
- [15] A.R. Casseb, A.V. Cruz, I.S. Jesus, J.O. Chiang, L.C. Martins, S.P. Silva, D.F. Henriques, L.M.N. Casseb, P.F.C. Vasconcelos. Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazilian Amazon. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 20 (2014). <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-9>
- [16] N. Lopes, R.E.C. Linhares, C. Nozawa. General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil. *Rev Pan-Amaz Saude* 3 (2014) 55-64. doi: 10.5123/S2176-62232014000300007
- [17] M.A. Farha, E.D. Brown. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol* 4 (2019) 565-577. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0357-1>
- [18] E. Petrova. Innovation in the pharmaceutical industry: the process of drug discovery and development. In: Ding M, Eliashberg J, Stremersch S, SpringerLink (Online service) (eds). *Innovation and Marketing in the Pharmaceutical Industry Emerging Practices, Research, and Policies*. Springer, New York, NY, 2018, pp 19-81. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7801-0_2
- [19] W. Zheng, W. Sun, A. Simeonov. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *British Journal of Pharmacology*, 175 (2017) 181–191. <https://doi.org/10.1111/bph.13895>
- [20] NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) Epub D8-D13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
- [21] G. Kuno, G.J. Chang, K.R. Tsuchiya, N. Karabatsos, C.B. Cropp. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol.* 72 (1998) 73-83. DOI: 10.1128/JVI.72.1.73-83.1998

- [22] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215 (1990) 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- [23] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- [24] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 12 (2015) 7-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- [25] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 22 (2006) 195-201. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>
- [26] G. Schneider G. Virtual screening: an endless staircase? *Nat Rev Drug Discov.* 9 (2010) 273-276. <https://doi.org/10.1038/nrd3139>
- [27] G. Sliwoski, S. Kothiwale, J. Meiler, E.W. Lowe Jr Computational methods in drug discovery. *Pharmacol Rev.* 66 (2014), 334–395. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>
- [28] T. Sterling, J.J. Irwin. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model.* 55 (2015) 2324-2337. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>
- [29] C.S. de Magalhães, D.M. Almeida, H.J.C Barbosa, L.E. Dardenne. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Inf Sci.* 289 (2014) 206-224. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2014.08.002>
- [30] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : Rename 2020 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2020. pp. 217. https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_medicamentos_rename_2020.pdf (accessed 25 January 2021)
- [31] S. Salentin, S. Schreiber, V.J. Haupt, M.F. Adasme, M. Schroeder. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) W443–447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>
- [32] R.A. Laskowski, M.B. Swindells. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model.* 51 (2011) 2778-2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- [33] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput*

Chem. 25 (2004) 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

[34] C. Hulo C, E. de Castro, P. Masson, L. Bougueleret, A. Bairoch, I. Xenarios, P. Le Mercier. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) D576-582. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>

[35] UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D506-515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>

[36] N.J. da Fonseca Jr, M.Q. Lima Afonso, N.G. Pedersolli, L.C. de Oliveira, D.S. Andrade, L. Bleicher. Sequence, structure and function relationships in flaviviruses as assessed by evolutive aspects of its conserved non-structural protein domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 492 (217) 565-571. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.041>

[37] D. Montes-Grajales, H. Puerta-Guardo, D.A. Espinosa, E. Harris, W. Caicedo-Torres, J. Olivero-Verbel, E. Martínez-Romero. In silico drug repurposing for the identification of potential candidate molecules against arboviruses infection. *Antiviral Res.* 173 (2020) 104668. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104668>

[38] M.A. Smith, R.E. Regal, R.A. Mohammad. Daclatasvir: A NS5A Replication Complex Inhibitor for Hepatitis C Infection. *Ann Pharmacother.* 50 (2016) 39-46. <https://doi.org/10.1177/1060028015610342>

[39] k. De Beule, J. Van Gestel J. Pharmacology of itraconazole. *Drugs.* 61 (2001) 27-37. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161001-00003>

[40] H.R. Chen, Y.C. Lai, T.M. Yeh TM. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *J Biomed Sci.* 25 (2018) 58. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0>

[41] S. Patel, A. Sinigaglia, L. Barzon, M. Fassan, F. Sparber, S. LeibundGut-Landmann, M. Ackermann. Role of NS1 and TLR3 in Pathogenesis and Immunity of WNV. *Viruses.* 11 (2019) 603. <https://doi.org/10.3390/v11070603>

[42] M. Rastogi, N. Sharma, S.K. Singh. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J.* 13 (2016) 131. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>

[43] S. Schloer, J. Goretzko, S. Pleschka, S. Ludwig, U. & Rescher. Combinatory Treatment with Oseltamivir and Itraconazole Targeting Both Virus and Host Factors in Influenza A Virus Infection. *Viruses.* 12 (2020) 703. doi:10.3390/v12070703

[44] A. Shim, J.-H. Song, B.-E. Kwon, J.-J. Lee, J.-H. Ahn, Y.-J. Kim, K.-J. Rhee, S.-Y. Chang, Y. Cha, Y.-S. Lee, M.-N. Kweon, K. S. Park, D.-E. Kim, S. Cho, H.-J. Cho & H.-J Ko. Therapeutic and prophylactic activity of itraconazole against human rhinovirus infection in a murine model. *Scientific Reports*, (2016). doi:10.1038/srep23110

[45] E. Van Damme, S. De Meyer, D. Bojkova, S. Ciesek, J. Cinatl, S. De Jonghe D. Jochmans, P. Leyssen, C. Buyck, J. Neyts, M. Van Loock. In vitro activity of itraconazole against SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology*, 93 (2021), 4454–4460. doi:10.1002/jmv.26917

Appendices

Box A.1. ROCV proteins and their protein family (Pfam) catalogue entry.

Structural proteins	
Capsid protein c (core protein)	Flavivirus capsid protein C; pfam01003
Protein prM	Flavivirus polyprotein propeptide; pfam01570
Small envelope protein M	Flavivirus envelope glycoprotein M; cd17038
Envelope protein E	Flavivirus glycoprotein, central and dimerization domains; pfam00869 Immunoglobulin-like domain III (C-terminal domain) of Flavivirus envelope glycoprotein E; cd12149 Flavivirus envelope glycoprotein E, stem/anchor domain; TIGR04240
Non-structural proteins	
Non-structural protein 1 (NS1)	Flavivirus non-structural protein NS1; pfam00948
Non-structural protein 2A (NS2A)	Flavivirus non-structural protein NS2A; pfam01005
Non-structural protein 2B (NS2B)	Flavivirus non-structural protein NS2B; pfam01002
Non-structural protein 3 (NS3)	Peptidase S7, Flavivirus NS3 serine protease; pfam00949 Flavivirus DEAD domain; pfam07652 C-terminal helicase domain of viral helicase; cd18806
Non-structural protein 4A (NS4A)	Flavivirus non-structural protein NS4A; pfam01350
Non-structural protein 4B (NS4B)	Flavivirus non-structural protein NS4B; pfam01349
Non-structural protein 5 (NS5)	Fts-J like methyltransferase; pfam01728 Flavivirus RNA-directed RNA polymerase; pfam00972

Table A.1 Docking results for selected drugs available at RENAME and ROCV proteins.

Rank	Drug	Synonym	Score	Total Energy	Intermolecular Energy	VdW Energy	Electrostatic Energy
Capsid C							
1	Daclatasvir		-9.823	132.638	-30.886	-31.615	0.729
12	Chlorhexidine		-9.144	-51.718	-32.500	-25.061	-7.439
17	Maraviroc		-9.016	2.837.719	-21.062	-19.995	-1.067
22	Coreg	Carvedilol	-8.912	66.161	-21.168	-19.837	-1.331
25	Ombitasvir		-8.885	242.927	-31.069	-25.777	-5.292
27	Ite	Itraconazole	-8.867	192.329	-27.132	-26.039	-1.093
36	Olysio	Simeprevir	-8.756	603.070	-34.714	-22.462	-12.252
38	Eltrombopag		-8.740	63.606	-50.449	-18.122	-32.327
46	Lipitor	Atorvastatin	-8.683	92.809	-52.450	-12.821	-39.629
50	Ventavis	Iloprost	-8.655	103.195	-29.510	-20.530	-8.980
Polyprotein propeptide							
8	Olysio	Simeprevir	-9.169	717.125	-30.760	-28.116	-2.644
14	Ite	Itraconazole	-9.001	169.705	-31.770	-27.690	-4.080
17	Sqv	Saquinavir	-8.958	273.977	-31.414	-24.115	-7.299
23	Nix	Permetrin	-8.829	88.172	-25.224	-24.233	-0.991
30	Ventavis	Iloprost	-8.784	81.266	-28.480	-23.860	-4.620
32	Donepezil		-8.736	100.024	-29.349	-24.889	-4.460
34	Risperdal		-8.718	40.910	-27.528	-22.497	-5.031
35	Lpv	Lopinavir	-8.710	117.134	-35.894	-24.416	-11.478
40	Coartem	Artemeter	-8.683	85.624	-29.864	-21.444	-8.420
47	Nix	Permetrin	-8.655	151.214	-26.457	-24.279	-2.178
48	Zofran	Ondansetrone	-8.654	28.637	-25.459	-19.140	-6.319
49	Maraviroc		-8.647	2.828.274	-30.365	-21.103	-9.262
Envelope glycoprotein M							
29	Loratadine		-9.064	487.871	-25.388	-23.587	-1.801
38	Capex	Fluocinolone	-8.996	477.916	-25.059	-25.789	0.730
40	Proscar	Finasteride	-8.989	337.426	-26.209	-22.996	-3.213
44	Ombitasvir		-8.975	246.655	-27.093	-27.069	-0.024
49	Doxazosin		-8.949	60.319	-26.793	-25.900	-0.893
Envelope glycoprotein E - Central and dimerization domain							
11	Ventavis	Iloprost	-9.117	102.439	-34.719	-22.269	-12.450
21	DB01045	Rifampicin	-8.939	492.483	-40.748	-22.017	-18.731
23	DB00877	Rapamycin/ Sirolimus	-8.916	1.286.480	-34.268	-26.562	-7.706
26	Loratadine		-8.884	488.875	-24.545	-22.259	-2.286
30	DB01590	Everolimus	-8.853	953.679	-33.485	-29.958	-3.527
34	DB00681	Amphotericin B	-8.814	559.798	-36.573	-23.347	-13.226
38	Lpv	Lopinavir	-8.718	119.122	-32.124	-29.524	-2.600
44	Sqv	Saquinavir	-8.674	379.114.560	-33.105	-28.807	-4.298
46	Maraviroc		-8.664	2.828.326	-31.221	-22.289	-8.932
50	Ite	Itraconazole	-8.635	185.691	-35.455	-29.960	-5.495

Rank	Drug	Synonym	Score	Total Energy	Intermolecular Energy	VdW Energy	Electrostatic Energy
Envelope glycoprotein E – Ig-Like domain							
11	Tpv	Tipranavir	-9.400	141.474	-33.251	-28.133	-5.118
15	DB06290	Simeprevir/ Olysio	-9.202	724.314	-35.439	-25.605	-9.834
16	Daclatasvir		-9.151	132.094	-31.789	-29.760	-2.029
21	Tacrolimus		-9.109	3.464.773	-28.818	-29.591	0.773
27	Atazanavir		-9.005	197.184	-26.712	-26.227	-0.485
37	Ombitasvir		-8.894	241.904	-32.149	-26.537	-5.612
40	DB00615	Rifabutin	-8.871	835.053	-36.271	-25.410	-10.861
43	Nizoral	Cetoconazole	-8.859	176.056	-27.892	-20.541	-7.351
45	Chlorhexidine		-8.810	-59.911	-39.536	-23.182	-16.354
48	Sqv	Saquinavir	-8.773	379.110.237	-37.581	-22.932	-14.649
49	ltc	Itraconazole	-8.771	171.230	-29.738	-22.520	-7.218
Envelope glycoprotein E – Stem/Anchor domain							
6	Daclatasvir		-10.103	130.381	-32.278	-31.752	-0.526
12	DB00169	Cholecalciferol/ Vitamin D3	-9.772	737.814	-27.975	-27.767	-0.208
14	DB00615	Rifabutin	-9.750	837.187	-33.545	-31.383	-2.162
27	DB00877	Rapamycin/ Sirolimus	-9.464	1.289.792	-30.401	-28.485	-1.916
28	Midazolam		-9.460	109.680	-27.347	-24.819	-2.528
31	Dasabuvir		-9.442	68.760	-27.031	-26.358	-0.673
41	Nizoral	Cetoconazole	-9.365	520.427	-33.344	-26.979	-6.365
43	Norvir	Ritonavir	-9.354	54.866	-29.291	-28.228	-1.063
44	Nix	Permetrin	-9.354	87.256	-24.796	-24.782	-0.014
46	Atazanavir		-9.320	192.452	-31.208	-29.584	-1.624
50	Coreg	Carvedilol	-9.280	63.815	-23.870	-24.739	0.869
NS1							
2	Olysio	Simeprevir	-9.916	712.352	-41.382	-35.140	-6.242
10	Tpv	Tipranavir	-9.568	140.809	-34.724	-32.366	-2.358
14	Nizoral	Cetoconazole	-9.462	186.066	-35.820	-32.906	-2.914
16	Nizoral	Cetoconazole	-9.454	169.874	-33.823	-32.008	-1.815
19	Nizoral	Cetoconazole	-9.410	519.851	-33.757	-31.866	-1.891
20	DB00169	Cholecalciferol/ Vitamin D3	-9.403	736.462	-29.509	-27.717	-1.792
21	Maraviroc		-9.397	2.824.582	-34.351	-30.356	-3.995
25	DB00615	Rifabutin	-9.351	836.775	-35.317	-30.087	-5.230
26	DB01590	Everolimus	-9.337	948.064	-41.043	-33.207	-7.836
30	Olysio	Simeprevir	-9.302	599.618	-37.205	-28.248	-8.957
44	ltc	Itraconazole	-9.209	181.473	-37.812	-35.988	-1.824
46	Ventavis	Iloprost	-9.195	79.044	-32.678	-31.047	-1.631
47	ltc	Itraconazole	-9.188	166.712	-37.940	-32.855	-5.085
NS2A							
2	Olysio	Simeprevir	-9.682	610.762	-27.889	-27.691	-0.198
3	Ventavis	Iloprost	-9.558	82.032	-30.950	-28.490	-2.460
8	Nizoral	Cetoconazole	-9.303	191.030	-31.557	-22.517	-9.040
11	Nix	Permetrin	-9.220	90.627	-22.711	-22.348	-0.363
12	ltc	Itraconazole	-9.184	192.606	-24.840	-24.643	-0.197
13	Daclatasvir		-9.164	135.034	-29.558	-27.719	-1.839
20	DB00169	Cholecalciferol/ Vitamin D3	-9.036	744.669	-21.783	-20.323	-1.460
41	Doxazosin		-8.821	72.744	-25.026	-23.583	-1.443
44	ltc	Itraconazole	-8.796	174.685	-27.760	-22.722	-5.038
46	Eprolin	Vitamin E	-8.773	123.920	-22.545	-19.805	-2.740
49	Lipitor	Atorvastatin	-8.763	100.057	-39.806	-16.991	-22.815

Rank	Drug	Synonym	Score	Total Energy	Intermolecular Energy	VdW Energy	Electrostatic Energy
NS2B							
8	Itrc	Itraconazole	-9.129	170.550	-30.626	-26.052	-4.574
10	Ventavis	Iloprost	-9.026	104.464	-28.041	-25.761	-2.280
12	DB06290	Simeprevir/ Olysio	-9.007	726.639	-31.462	-29.891	-1.571
19	Eprolin	Vitamin E	-8.851	122.649	-23.530	-23.650	0.120
20	Midazolam		-8.848	115.093	-21.333	-21.277	-0.056
21	Olysio	Simeprevir	-8.844	716.916	-34.138	-23.516	-10.622
26	Coartem	Artemeter	-8.753	78.727	-37.854	-23.331	-14.523
34	Proscar	Finasteride	-8.668	341.709	-21.937	-20.885	-1.052
38	Ombitasvir		-8.636	243.328	-30.581	-24.914	-5.667
44	Ventavis	Iloprost	-8.602	77.476	-32.130	-25.294	-6.836
48	Atazanavir		-8.580	194.926	-29.648	-22.701	-6.947
50	Omeprazole		-8.562	37.756	-24.496	-20.996	-3.500
NS3							
5	DB00169	Cholecalciferol/ Vitamin D3	-9.159	738.928	-26.965	-26.022	-0.943
13	Daclatasvir		-8.913	127.785	-36.241	-27.708	-8.533
15	Lpv	Lopinavir	-8.859	120.182	-30.627	-22.363	-8.264
16	Tacrolimus		-8.850	3.464.106	-29.371	-24.498	-4.873
23	Olysio	Simeprevir	-8.747	713.586	-36.430	-27.555	-8.875
31	Ventavis	Iloprost	-8.647	101.681	-31.668	-29.164	-2.504
34	Doxazosin		-8.602	66.008	-31.530	-21.048	-10.482
35	DB06290	Simeprevir/ Olysio	-8.591	727.158	-31.286	-23.294	-7.992
39	Nix	Permetrin	-8.566	89.522	-25.397	-24.244	-1.153
42	Itrc	Itraconazole	-8.546	169.274	-32.356	-26.156	-6.200
49	Itrc	Itraconazole	-8.513	186.800	-31.636	-26.243	-5.393
50	DB00681	Amphotericin B	-8.511	560.903	-35.187	-18.541	-16.646
NS3 – DEAD domain							
12	Itrc	Itraconazole	-9.261	170.155	-31.283	-29.435	-1.848
13	DB00681	Amphotericin B	-9.225	559.751	-36.027	-31.664	-4.363
18	Tacrolimus		-9.022	3.464.029	-29.336	-23.217	-6.119
22	Sqv	Saquinavir	-8.908	379.116.415	-35.849	-26.931	-8.918
23	Daclatasvir		-8.894	131.738	-31.049	-28.415	-2.634
24	DB06290	Simeprevir/ Olysio	-8.859	728.059	-29.780	-21.842	-7.938
26	Itrc	Itraconazole	-8.855	190.773	-31.738	-25.436	-6.302
28	Sqv	Saquinavir	-8.777	273.764	-35.755	-26.046	-9.709
31	Ventavis	Iloprost	-8.753	87.693	-31.740	-24.376	-7.364
36	Olysio	Simeprevir	-8.704	607.160	-31.582	-23.565	-8.017
37	Lpv	Lopinavir	-8.686	119.269	-32.280	-22.252	-10.028
38	Ventavis	Iloprost	-8.675	102.647	-30.172	-21.749	-8.423
45	Nizoral	Cetoconazole	-8.626	175.189	-28.041	-21.260	-6.781
47	DB00169	Cholecalciferol/ Vitamin D3	-8.584	743.951	-21.970	-20.789	-1.181
49	Midazolam		-8.574	116.783	-19.645	-19.178	-0.467

Rank	Drug	Synonym	Score	Total Energy	Intermolecular Energy	VdW Energy	Electrostatic Energy
NS3 – Helicase domain							
4	Olysio	Simeprevir	-8.623	719.305	-29.811	-22.367	-7.444
9	DB00169	Cholecalciferol/ Vitamin D3	-8.550	740.497	-26.196	-22.445	-3.751
10	Daclatasvir		-8.544	131.400	-33.532	-25.094	-8.438
15	Nizoral	Cetoconazol	-8.463	526.791	-27.113	-24.565	-2.548
18	DB00877	Rapamycin/ Sirolimus	-8.454	1.290.256	-30.403	-23.287	-7.116
23	Atazanavir		-8.401	197.911	-26.000	-23.638	-2.362
30	DB06290	Simeprevir/ Olysio	-8.291	725.038	-33.551	-18.300	-15.251
36	Sqv	Saquinavir	-8.232	272.149	-36.564	-23.605	-12.959
39	Tacrolimus		-8.216	3.465.944	-27.207	-26.593	-0.614
40	Nizoral	Cetoconazole	-8.211	244.835	-28.718	-25.212	-3.506
46	Nizoral	Cetoconazole	-8.179	174.780	-29.845	-23.564	-6.281
49	Atorvastatin		-8.159	64.967	-37.082	-18.427	-18.655
NS4A							
14	Lpv	Lopinavir	-9.049	123.396	-27.978	-27.026	-0.952
28	Atazanavir		-8.873	197.308	-27.139	-26.179	-0.960
32	Nix	Permetrin	-8.819	141.981	-26.334	-25.866	-0.468
37	Nizoral	Cetoconazole	-8.768	529.266	-24.168	-22.586	-1.582
46	Omeprazole		-8.718	43.248	-22.478	-21.727	-0.751
NS4B							
4	Daclatasvir		-9.880	130.290	-33.855	-33.110	-0.745
5	Lpv	Lopinavir	-9.832	119.385	-32.806	-30.759	-2.047
13	Itc	Itraconazole	-9.514	170.309	-31.306	-29.895	-1.411
15	Eprolin	Vitamin E	-9.421	118.596	-27.113	-25.842	-1.271
31	Itc	Itraconazole	-9.202	191.704	-30.877	-27.232	-3.645
38	DB00169	Cholecalciferol/ Vitamine D3	-9.110	741.784	-24.100	-24.236	0.136
39	Coartem	Artemeter	-9.103	88.923	-28.280	-27.447	-0.833
40	Ventavis	Iloprost	-9.098	87.505	-29.751	-28.649	-1.102
41	DB01590	Everolimus	-9.097	954.540	-32.154	-27.031	-5.123
44	DB00681	Amphotericin B	-9.068	560.188	-35.611	-28.974	-6.637
46	Ventavis	Iloprost	-9.060	79.488	-31.128	-31.100	-0.028
47	Sqv	Saquinavir	-9.052	277.500	-29.831	-29.758	-0.073
48	Bromocriptine		-9.041	217.252	-26.673	-27.445	0.772
NS5 – Fts-J like Methyltransferase							
6	Zofran	Ondansetrone	-8.957	25.955	-28.118	-27.351	-0.767
8	Doxazosin		-8.935	54.485	-34.555	-31.382	-3.173
9	DB01590	Everolimus	-8.928	956.469	-33.035	-22.427	-10.608
33	Itc	Itraconazole	-8.618	188.800	-34.118	-26.666	-7.452
34	DB06290	Simeprevir/ Olysio	-8.610	719.067	-40.514	-29.221	-11.293
37	Diabeta	Glibenclamide	-8.585	4.141	-38.189	-23.522	-14.667
44	Ombitasvir		-8.564	246.024	-27.998	-27.414	-0.584
48	Primogyn	Estradiol valerate	-8.548	168.436	-31.023	-21.300	-9.723

Rank	Drug	Synonym	Score	Total Energy	Intermolecular Energy	VdW Energy	Electrostatic Energy
NS5 – RNA Polymerase							
2	Olysio	Simeprevir	-9.926	710.316	-38.521	-36.163	-2.358
4	Tacrolimus		-9.662	3.457.089	-36.168	-35.451	-0.717
8	Itc	Itraconazole	-9.422	157.738	-43.783	-36.804	-6.979
11	Nizoral	Cetoconazole	-9.390	184.467	-37.778	-35.825	-1.953
17	Itc	Itraconazole	-9.212	180.852	-38.571	-33.713	-4.858
18	Daclatasvir		-9.173	124.558	-40.198	-39.048	-1.150
19	Sqv	Saquinavir	-9.140	379.108.395	-39.768	-35.994	-3.774
21	Nizoral	Cetoconazole	-9.123	240.695	-34.974	-31.365	-3.609
24	Erythromycin		-9.106	649.802	-33.872	-32.036	-1.836
34	DB00615	Rifabutin	-9.026	835.478	-35.345	-32.207	-3.138
35	Dasabuvir		-9.016	60.502	-38.378	-28.761	-9.617
36	Nizoral	Cetoconazole	-9.016	167.616	-34.971	-33.492	-1.479
38	Loratadine		-8.992	484.825	-28.730	-27.919	-0.811
42	Sqv	Saquinavir	-8.967	1.207.292	-30.733	-29.929	-0.804
48	Olysio	Simeprevir	-8.905	600.288	-38.527	-26.476	-12.051

5. DISCUSSÃO

A estratégia de reposicionamento de fármacos se tornou uma aliada para a rápida triagem e direcionamento de moléculas já aprovadas para o tratamento de doenças novas e reemergentes. Levando em consideração que cerca de dois terços dos fármacos em desenvolvimento não possuem eficácia comprovada e não têm um índice aceitável de toxicidade em testes clínicos, a perspectiva de tratamento para surtos de doenças negligenciadas se torna cada vez mais onerosa e prolongada para o desenvolvimento de novos candidatos (Farha & Brown, 2018; Petrova, 2014; Zheng *et al.*, 2018).

Tendo esta perspectiva para este estudo, investigamos os potenciais candidatos aprovados pelo FDA e presentes no RENAME para reposicionamento de fármacos em caso de uma re-emergência de infecções pelo vírus Rocio no Brasil, visto que dados sugerem a circulação do vírus pelo território brasileiro e os testes diagnósticos possuem baixa capacidade de identificação para arbovírus diferentes de DENV e CHIKV (Casseb *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Silva, 2018).

O ROCV é um vírus do gênero *Flavivirus*, +ssRNA capaz de produzir uma poliproteína precursora de 3425 aminoácidos que possui 16 regiões codificantes para suas treze proteínas estruturais e não-estruturais (Kuno & Chang, 2005). Devido sua caracterização molecular tardia e falta de interesse após a epidemia de encefalite dos anos 1970, as proteínas do ROCV não estão elucidadas e incorporadas nas bases de dados. Neste estudo, realizamos a modelagem molecular destas proteínas a fim de servirem como base para estudos de interação de moléculas aprovadas pelo FDA a partir da metodologia de atracamento molecular.

Com o intuito de selecionar fármacos aprovados pelo FDA disponíveis na RENAME, foi realizada uma filtragem manual das 800 moléculas de acordo com a versão do ano de 2020 desta relação. Esta seleção incluiu drogas presentes nesta versão, com ou sem utilização combinada, levando em consideração as exclusões desta lista. Destas 800 moléculas, cerca de 21,7% estavam presentes na Relação, sendo 3% dessas moléculas drogas excluídas da versão atual. Cerca de 8% foram excluídas por serem moléculas sem identificação na base de dados. Ainda, a molécula do atracúrio, que não está presente na Relação, foi uma das

moléculas de maior prevalência na lista com presença nas primeiras posições (9%). Totalizando, cerca de 39% das moléculas selecionadas nas 50 primeiras posições foram catalogadas. Deve-se levar em conta que as moléculas presentes na lista podem ou não se repetir no mesmo ou em diferentes atracamentos.

Visando selecionar as melhores moléculas e alvos para a continuidade do estudo, buscou-se avaliar os melhores *scores* dentro das moléculas selecionadas, sua frequência e ausência no atracamento, juntamente com suas propriedades de posologia, toxicidade e uso.

As moléculas que apresentaram melhor *score* foram os antivirais daclatasvir (-10.103 para proteína E do envelope; -9.880 para proteína NS4B e 9.823 para proteína C do capsídeo) e o simeprevir (9.926 para a RNA polimerase e -9.880 para a proteína NS1). Entretanto, esta segunda molécula foi excluída da versão atual do RENAME devido à descontinuidade do medicamento pela indústria farmacêutica. Ambas as moléculas são indicadas para o tratamento da hepatite C em uso combinado com outros medicamentos.

Ainda, a molécula mais frequente nesta seleção foi o itraconazol, um antifúngico triazólico presente como ligante potencial de 12 das 16 proteínas, seguido por simeprevir (11/16), iloprost (9/16), daclatasvir (9/16), cetoconazol (8/16), saquinavir (8/16), lopinavir (8/16), permetrina (5/16) e tipranavir (2/16).

Levando em consideração os alvos moleculares, os maiores *scores* foram observados na proteína E do envelope, seguido das proteínas não-estruturais NS1, NS4B, proteína C do capsídeo e RNA polimerase.

Por fim, foram selecionadas quatro moléculas, sendo elas: simeprevir, daclatasvir, iloprost e itraconazol, para prosseguir com avaliação e triagem no DrugBank levando em conta os diversos aspectos para uso, posologia, contraindicações e aspectos moleculares. Interessantemente, Montes-Grajales e colegas (2020) realizaram uma identificação *in silico* de potenciais moléculas para reposicionamento e uso no tratamento de dengue, zika e chikungunya. Cinco moléculas, dentre elas pranlukast, nilotinib, conivaptan, itraconazol e novobiocina, foram selecionadas para análises *in vitro*. Embora demonstrando uma boa afinidade *in silico*, este antifúngio não demonstrou atividade antiviral significativa *in vitro*.

Tendo em vista estes aspectos, foram selecionados apenas as moléculas do itraconazol e do daclatasvir para análises posteriores de atracamento cego e localizado no sítio ativo das proteínas, exceto na proteína não-estrutural NS4A e glicoproteína M do envelope que não obtiveram resultados para estes fármacos.

A partir das análises realizadas, observamos um melhoramento no atracamento do itraconazol junto às proteínas estudadas. Entretanto, este mesmo melhoramento não foi possível quando utilizada a molécula do daclatasvir. A partir deste resultado observamos que a proteína NS1 se revelou uma forte candidata como molécula-alvo do itraconazol, visto que, além do score interessante frente a atracamento molecular, possui papel essencial na replicação viral e atuação das outras proteínas. Este resultado se mostrou bastante interessante, visto que esta proteína está relacionada com o recrutamento de outras proteínas não-estruturais e desempenha papel importante no ciclo viral dos flavivírus. Alguns autores já demonstram esta molécula como um alvo em potencial para o tratamento da zika e dengue (Cavazzoni et al., 2020; Gonçalves et al., 2020).

Podemos apontar alguns pontos fortes e limitações em nosso estudo. Dentre os pontos fortes, destacamos o fato de que não existem estruturas moleculares das proteínas estruturais e não-estruturais do vírus Rocio disponíveis em bases de dados, nem estudos relacionando o reposicionamento de fármacos disponíveis no Sistema Único de Saúde para esta arbovirose. A fim de uma melhor segurança na predição deste candidato, estudos de dinâmica molecular e outras análises de interação são necessárias, juntamente com ensaios *in vitro* no redirecionamento desta molécula para tratamento desta e outras arboviroses.

6. APÊNDICES

Proteínas estruturais e não-estruturais do vírus Rocio

A poliproteína genômica resulta em proteínas maduras após clivagens enzimáticas específicas que ocorrem no retículo endoplasmático da célula hospedeira, dentre elas: a proteína C do capsídeo, a proteína prM, o peptídeo pr, as proteína M e E do envelope viral, as proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Essas proteínas possuem papéis estruturais e não-estruturais no ciclo viral e serão explicitadas a seguir (Medeiros et al., 2007).

Proteína C do Capsídeo (core protein)

Esta proteína possui 113 aminoácidos e está presente em homodímeros possui função ligante à célula do hospedeiro e de montagem do RNA em um nucleocapsídeo que forma o *core* da partícula viral madura. Além disso, é capaz de induzir a penetração do genoma viral no citoplasma após sua fusão parcial com as proteínas de superfície, migrando para o núcleo de modo a modular funções celulares (The Uniprot Consortium, 2019). Ainda, podem interagir com EXOC1 (gene que regula o complexo de exocisto que possui efeito antiviral em flavivírus) e DICER para degradação. Seus domínios transmembrana contêm um sinal de retenção do retículo endoplasmático.

Corroborando com resultados da literatura, foi encontrado percentual de identidade de 56% com a proteína do capsídeo do vírus Kujin e 50% de identidade com a proteína do capsídeo do vírus da encefalite japonesa (JEV).

Proteína prM e peptídeo pr

A proteína prM age como uma chaperona durante a montagem intracelular do vírion, bloqueando a ativação da proteína E do envelope pela formação de heterodímeros no retículo endoplasmático. Possui 81 aminoácidos e identidade de cerca de 65% com a cadeia D do peptídeo pr do WNV.

Ainda, possui modificação pós-traducional, quando uma furina cliva a proteína em duas porções: proteína M do envelope e no peptídeo pr. Esta clivagem pode ser incompleta em cerca de 30% das partículas virais, podendo ter uma função não esclarecida na evasão do sistema imunológico (The Uniprot Consortium, 2019). Já o peptídeo pr previne a fusão prematura das proteínas do envelope no aparato transgolgi ligando-se à proteína E do envelope e se dissociando de seus dímeros após a liberação do vírion.

Proteína M do envelope (matrix protein)

Possui identidade de cerca de 60% com outros flavivírus, como o ZIV e JEV. Sua estrutura contém 75 aminoácidos. Exerce efeitos citotóxicos devido a seu ectodomínio que estimula a apoptose mitocondrial. Ainda, possui função no brotamento viral e é suposto que possua atividades de viroporina. Esta proteína está presente na membrana do vírion e no retículo endoplasmático da célula hospedeira (The Uniprot Consortium, 2019).

Proteína E do envelope

Possui função de ligação aos receptores de superfície e de invasão celular pela fusão das membranas. Faz parte da membrana do vírion juntamente com a proteína prM. Além disso, possui função no brotamento de virions, onde as novas partículas possuem cerca de 60 heterodímeros de proteína prM e proteína E. A modificação do pH ao longo do aparato de Golgi ocasiona a dissociação da proteína prM e a formação de dímeros de proteína E. Além disso, possui sítio de N-glicosilação e interage com as proteína NS1 (The Uniprot Consortium, 2019).

Os monômeros da proteína E dos membros da família Flaviviridae pertencem à classe de proteínas de fusão de classe II e são compostos por três domínios distintos (EDI, EDII e EDIII), sendo unidos na porção da membrana viral por meio de uma porção “âncora” (*anchor domain*). Estes monômeros são capazes de sofrer alterações conformacionais durante as fases do ciclo viral, em especial durante a fusão das membranas da célula hospedeira e da partícula viral,

onde ocorre a exposição da porção terminal do EDII altamente conservada, conhecida como fusion loop ou peptídeo de fusão (Zhang et al., 2017).

- *Domínios central e de dimerização (EDI e EDII)*

Contém 297 aminoácidos e possui cerca de 60% de identidade com proteínas dos WNV e JEV. Os domínios I e II são peptídeos descontínuos ligados por quatro peptídeos ligantes. O domínio EDI é conhecido por possuir função de antígeno não-neutralizante e estabilização da molécula, enquanto o domínio EDII envolve a interação entre a partícula viral e a célula infectada (Zhang et al., 2017).

- Domínio immunoglobulin-like (EDIII)

O domínio III possui um formato globular e está localizado na porção C-terminal do monômero. Está acoplado às duas hélices “hastes” (*stem*) e às duas hélices transmembrana. Em geral nos flavivírus possui um formato de barril- β com seis fitas β antiparalelas. Ainda, possui epítomos com atividade importante contra anticorpos neutralizantes, o que o torna um alvo interessante no desenvolvimento de vacinas (Zhang et al., 2017).

A sequência deste domínio presente no ROCV contém 93 aminoácidos e possui cerca de 60% de identidade com outras proteínas do envelope do vírus da encefalite japonesa e do vírus Usutu.

- Domínio *stem/anchor*

Esta região da proteína E do envelope dos flavivírus consiste em dois domínios catiônicos, hélice transmembrana e anfipáticos (TM1 e TM2). Enquanto a primeira porção age como uma proteína de parada de transferência, a segunda atua como uma sequência sinal interna que direciona a proteína não-estrutural NS1 (Zhang et al., 2017).

Este domínio contém 97 aminoácidos e possui aproximadamente 70% de identidade com a proteína E do envelope do JEV. Ainda, possui identidade de

cerca de 38% com proteínas transmembrana do *Homo sapiens*.

Proteína não-estrutural NS1

Esta proteína está localizada no retículo endoplasmático e é secretada N-glicosilada em forma homohexamérica. Interage com a proteína E do envelope e NS4B, além de interagir com a proteína complemento CFH do hospedeiro levando à degradação de C3.

Possui três destinos após sua clivagem: (i) ciclo de replicação, onde é necessária para a formação do complexo de replicação e recrutamento de outras proteínas NS nas estruturas de membrana do retículo endoplasmático; (ii) membrana plasmática e (iii) compartimento extracelular, sendo excretada em lipopartículas antagonizando função do complemento e auxiliando na evasão do sistema imunológico, inibindo a transdução de sinal do TLR3 (The Uniprot Consortium, 2019).

A proteína NS1 do ROCV possui 355 aminoácidos e cerca de 60% de identidade com os vírus da zika, encefalite japonesa e oeste do Nilo.

Proteína não-estrutural NS2A

A proteína NS2A possui 132 aminoácidos e não possui nenhum percentual de identidade com outras proteínas do *Protein Data Bank*. Esta proteína de aproximadamente 22kDa, tem função na montagem do vírion e antagoniza a resposta de interferon α/β com atividade antiviral. É um componente do complexo de replicação do RNA viral presente no retículo endoplasmático da célula hospedeira. Além disso, interage com a serino-protease NS3 via N-terminal. Sua porção C-terminal está localizada no citosol e é gerada pela protease viral (The Uniprot Consortium, 2019; Xie et al., 2013).

Proteína não-estrutural NS2B

A proteína não-estrutural NS2B possui 127 aminoácidos e possui cerca de 70% de identidade com a flavivirina do vírus da encefalite do vale Murray (MVEV) e também é conhecida como subunidade NS2B regulatória da protease flavivirina e atua um cofator necessário para a função da serino-protease NS3. Além disso, pode possuir atividade desestabilizante de membranas e atuar formando viroporinas. Está presente no retículo endoplasmático do hospedeiro podendo formar homo-oligômeros e heterodímeros com a NS3 e pode formar homo-oligômeros (The Uniprot Consortium, 2019).

Proteína não-estrutural NS3

A proteína não-estrutural NS3 está localizada na membrana do retículo endoplasmático e interage com as proteínas NS2A, NS4B e NS5 não fosforilada. Esta última interação estimula a atividade da guaniltransferase. Ainda, forma heterodímeros com a NS2B, seu cofator, de forma não covalente (The Uniprot Consortium, 2019).

É conhecida entre os flavivírus por possuir três atividades enzimáticas: (i) serino- protease em associação com a NS2B, realizando sua autoclivagem e a clivagem da prolioproteína em sítios dibásicos no citoplasma (C-prM, NS2A-NS2B, NS3-NS4A, NS41-2K, NS4B-NS5); (ii) NTPase e (iii) RNA helicase. A porção N-terminal desta proteína tem função de serino-protease, e não apresenta tanto solubilidade quanto atividade catalítica *in vitro*, sugerindo o envolvimento da proteína NS2B em seu enovelamento correto, atividade e aumento de solubilidade (Luo, Vasudevan & Vascar, 2015; The Uniprot Consortium, 2019).

Por outro lado, sua porção C-terminal possui atividade de NTPase e RNA helicase, compreendendo 3 subdomínios, que podem interagir com a proteína NS5. Por estar envolvida com a função da RNA polimerase, possui uma função vital no ciclo viral, podendo auxiliar na montagem correta de estruturas secundária. A helicase pertence à família de ATPases da superfamília 2 que

contém DEAD/DEAH box, com cerca de 80% de resíduos conservados, contendo principalmente resíduos de glutamina reconhecedores de adenina (da Fonseca Jr. et al., 2017; Li, Phoo & Luo, 2014; Wu et al., 2005).

A seguir estão citados os domínios da proteína não-estrutural NS3 encontrados na poliproteína genômica do vírus Rocio.

- Peptidase S7 - NS3 serino-protease

Este domínio da proteína do vírus Rocio possui 149 aminoácidos e identidade de cerca de 67% com os vírus da zika e do oeste do Nilo.

- Domínio DEAD

Este domínio da proteína NS3 do ROCV possui 146 aminoácidos e identidade de cerca de 80% com os domínios catalíticos da protease dos vírus Kujin, da encefalite japonesa e do vale Murray.

- Domínio helicase C-terminal

Este domínio possui 145 aminoácidos e identidade de cerca de 75% com os domínios helicase da proteína NS3 dos vírus Kujin e da encefalite japonesa.

Proteína não-estrutural NS4A

A proteína NS4A do ROCV contém 140 aminoácidos e não possui resultados de identidade semelhante a outras proteínas. Possui três resíduos desordenados. Esta proteína localizada no retículo endoplasmático possui função regulatória da atividade de ATPase da helicase NS3, permitindo a conservação de energia durante o desenovelamento. Ainda, sugere-se sua participação na autofagia, alterações de membrana e inibição de interferon (da Fonseca Jr. et al., 2017; The Uniprot Consortium, 2019).

Proteína não-estrutural NS4B

No vírus Rocio, possui 247 aminoácidos, sendo 12 resíduos desordenados. Não possui percentual de identidade com outras proteínas. É responsável pela indução da formação de vesículas do retículo endoplasmático necessárias para a replicação viral. É capaz de inibir a fosforilação STAT1 induzida por interferon, de modo a prevenir a ação antiviral na célula. Além disso, inibe a translocação STAT2 no núcleo após o tratamento do interferon α , função regulada pelo peptídeo sinal 2K. Interage com a serino-protease NS3 (The Uniprot Consortium, 2019).

RNA polimerase (NS5)

Está localizada principalmente no núcleo da célula hospedeira, entretanto pode ser encontrada na membrana do retículo endoplasmático e nas vesículas em brotamento. É capaz de formar homodímeros e possui modificações pós-traducionais pela fosforilação de resíduos de serina, que estimula a localização nuclear. Interage com STAT2 do hospedeiro que inibe a fosforilação. Após todas as proteínas virais estarem presentes, sinaliza essa para a degradação. Além disso, interage com a protease NS3 (The Uniprot Consortium, 2019).

É a proteína mais conservada do genoma dos flavivírus. Possui função de replicação do genoma viral e “*capping*” dos genomas no citoplasma, metilando a guanina N-7 e ribose 2'-O. Além disso, inibe a fosforilação de STAT2 e TYK2, prevenindo a sinalização JAK-STAT e ação antiviral da célula (da Fonseca Jr. et al., 2017; The Uniprot Consortium, 2019).

São conhecidos dois domínios da proteína NS5: um domínio metiltransferase (MTase) na região N-terminal e um domínio RNA polimerase RNA-dependente na região C-terminal. Ainda, estima-se que a NS5 possua atividade bloqueadora de interferon e de produção de citocinas (da Fonseca Jr. et al., 2017).

A seguir apresentamos os dois diferentes domínios da proteína não-

estrutural NS5 do ROCV.

- FTS *J-like* metiltransferase

Possui 168 aminoácidos e identidade de cerca de 70% com o domínio metiltransferase da proteína NS5 do vírus da dengue e do oeste do Nilo.

- RNA polimerase RNA-dependente

Possui 647 aminoácidos e identidade de cerca de 70% com a proteína NS5 do vírus da zika, Kunjin e da encefalite japonesa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AMARILLA, A. et al. Ilheus and Saint Louis encephalitis viruses elicit cross-protection against a lethal Rocio virus challenge in mice. *PLOS ONE*, v. 13, n. 6, p. e0199071, 2018.
- ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2005.
- BASSETTI, M. et al. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive Care Medicine*, v. 43, n. 10, p. 1464-1475, 2017.
- BEASLEY, D. et al. Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. *Journal of Virology*, v. 79, n. 13, p. 8339-8347, 2005.
- BERMAN, H.M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Combate ao Aedes Aegypti: prevenção e controle da Dengue, Chikungunya e Zika. Disponível em <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/aedes-aegypti>>. Acesso em: 21 de abr. 2020.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : Rename 2020 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 217 p.
- CASSEB, A. et al. Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazilian Amazon. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 20, n. 1, p. 9, 2014.
- CATÃO, R. Dengue no Brasil: abordagem geográfica na escala nacional. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. (Coleção PROPG Digital - UNESP). ISBN 9788579833328. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/109225>>.
- CAVAZZONI, C. et al. Sustained antibody response to ZIKV infection induced by NS1 protein is accompanied by the progressive appearance of autoreactive antibodies and cross-reactive B cell clones. *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.24.423863>.
- CDC International Conference on Emerging Infectious Diseases. Available at: <https://www.cdc.gov/iceid/index.html>.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). ArboCat Virus: Rocio (ROCV). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/arboCat/VirusDetails.aspx?ID=401>>.

Acesso em: 21 abr. 2020.

- DA FONSECA, N. et al. Sequence, structure and function relationships in flaviviruses as assessed by evolutive aspects of its conserved non-structural protein domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 492, n. 4, p. 565-571, 2017.
- DE BARROS, V. et al. An Experimental Model of Meningoencephalomyelitis by Rocio Flavivirus in Balb/C Mice: Inflammatory Response, Cytokine Production, and Histopathology. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 2, p. 363-373, 2011.
- DE MAGALHÃES, C. et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Information Sciences*, v. 289, p. 206-224, 2014.
- DORN, M. et al. Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Computational Biology and Chemistry*, v. 53, p. 251-276, 2014.
- DUARTE, J. et al. Climatic variables associated with dengue incidence in a city of the Western Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, 2019.
- ELLWANGER, J.H.; KAMINSKI V.L.; CHIES J.A.B. Rocio Virus: an overview. *Revista Peruana de Divulgación Científica en Genética y Biología Molecular*, v. 1, n. 2, p. 14-20, 2017.
- FARHA, M.; BROWN, E. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nature Microbiology*, v. 4, n. 4, p. 565-577, 2019.
- FIGUEIREDO, L. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.
- FRANCO, O. História da febre-amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Endemias Rurais, 1969. 208p.
- GONÇALVES, R. et al. Dynamic behavior of Dengue and Zika viruses NS1 protein reveals monomer–monomer interaction mechanisms and insights to rational drug design. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v.38, n. 14, p. 4353-4363, 2020.
- GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today?. *One Health*, v. 4, p. 1-13, 2017.
- HARRISON, A. et al. Myocardial and pancreatic necrosis induced by Rocio virus, a new flavivirus. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 32, n. 1, p. 102-113, 1980.
- HUGHES, D.; KARLÉN, A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v. 119, n. 2, p. 162-169, 2014.
- HULO, C. et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research*, v. 39, n. suppl_1, p. D576-D582, 2010.
- IBGE. Características urbanísticas do entorno dos domicílios | 2010 | IBGE. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/tipologias-do-territorio/24702-caracteristicas-urbanisticas-do-entorno-dos-domicilios.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 21 abr. 2020.

- IVERSSON, L. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovirus na região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. *Revista de Saúde Pública*, v. 14, n. 1, p. 9-35, 1980.
- KHARKAR, P. et al. Discovery of anti-Ebola drugs: a computational drug repositioning case study. *RSC Advances*, v. 6, n. 31, p. 26329-26340, 2016.
- KOH, C. et al. A randomized, proof-of-concept clinical trial on repurposing chlorcyclizine for the treatment of chronic hepatitis C. *Antiviral Research*, v. 163, p. 149-155, 2019.
- KUNO, G., CHANG, G.-J. J., TSUCHIYA, K. R., KARABATSOS, N. & CROPP, C. B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology* 72, 73–83. 1998
- LASKOWSKI, R.; SWINDELLS, M. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 51, n. 10, p. 2778-2786, 2011.
- LI, K.; PHOO, W.; LUO, D. Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors. *Virologica Sinica*, v. 29, n. 2, p. 74-85, 2014.
- LI, J. et al. The glycosylation site in the envelope protein of West Nile virus (Sarafend) plays an important role in replication and maturation processes. *Journal of General Virology*, v. 87, n. 3, p. 613-622, 2006.
- LINDENBACH, B.; RICE, C. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, p. 23-61, 2003.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
- LOPES, O. et al. EMERGENCE OF A NEW ARBOVIRUS DISEASE IN BRAZIL. *American Journal of Epidemiology*, v. 107, n. 5, p. 444-449, 1978.
- LOPES, O. et al. EMERGENCE OF A NEW ARBOVIRUS DISEASE IN BRAZIL. *American Journal of Epidemiology*, v. 108, n. 5, p. 394-401, 1978.
- LOPES, O.S., SACCHETTA, L.A., NASSAR, E.S., OLIVEIRA, M.I., BISORDI I., SUZUKI, A. et al. Avaliação sorológica de vacina contra a encefalite humana causada pelo vírus Rocio. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1980;22:108-13
- LUO, D.; VASUDEVAN, S.; LESCAR, J. The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. . Acesso em: 31 ago. 2020.
- MARTÍ-RENOM, M. et al. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 29, n. 1, p. 291-325, 2000.
- MCARTHUR, D. *Emerging Infectious Diseases*. *Nursing Clinics of North America*, v. 54, n. 2, p. 297-311, 2019.
- MEDEIROS, D. et al. Complete genome characterization of Rocio virus (*Flavivirus: Flaviviridae*), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. *Journal of General Virology*, v. 88, n. 8, p. 2237-2246, 2007.

- MITCHELL, C.; FORATTINI, O.; MILLER, B. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 20, n. 3, p. 171-177, 1986.
- MITCHELL, A.L. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, Jan 2019, (doi: 10.1093/nar/gky1100)
- MONTES-GRAJALES, D. et al. In silico drug repurposing for the identification of potential candidate molecules against arboviruses infection. *Antiviral Research*, v. 173, p. 104668, 2020.
- MORSE, S. S., & SCHLUEDERBERG, A. (1990). Emerging Viruses: The Evolution of Viruses and Viral Diseases. *Journal of Infectious Diseases*, 162(1), 1–7. doi:10.1093/infdis/162.1.1
- OLIVEIRA, R. et al. Previous dengue or Zika virus exposure can drive to infection enhancement or neutralisation of other flaviviruses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, 2019.
- PETROVA, E. Innovation in the pharmaceutical industry: the process of drug discovery and development. In: Ding M, Eliashberg J, Stremersch S, SpringerLink (Online service) (eds). *Innovation and Marketing in the Pharmaceutical Industry Emerging Practices, Research, and Policies*. Springer New York: New York, pp VI, 1122 p. 1177 illus., 1149 illus. in color. 2014.
- PETTERSEN, E. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- PINHEIRO P., TRAVASSOS DA ROSA A., VASCONCELOS P. Arboviroses. In : VERONESI, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo:Ed. Atheneu, 1996; v 1; c. 9; p. 169-179.
- RODRIGUES, A. et al. Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Virus Research*, v. 155, n. 1, p. 35-41, 2011.
- ROMANO-LIEBER, N.; IVERSSON, L. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n. 3, p. 236-242, 2000.
- SALENTIN, S. et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. W1, p. W443-W447, 2015.
- SAYERS, E. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D23-D28, 2018.
- SCHNEIDER, G. Virtual screening: an endless staircase?. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 4, p. 273-276, 2010.
- SETOH, Y. et al. Full genome sequence of Rocio virus reveal substantial variations from the prototype Rocio virus SPH 34675 sequence. *Archives of Virology*, v. 163, n. 1, p. 255-258, 2017.
- SILVA, F. Estudo sobre a circulação de arbovírus na população humana nas áreas de influência da Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço, estado do Pará, Brasil. 99 f.

Dissertação (Mestrado em Virologia) - Instituto Evandro Chagas, Programa de Pós-Graduação em Virologia, Ananindeua, 2018.

- SILVA, J. et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 4, p. 414-417, 2014.
- SIMMONDS, P., BECHER, B., BUKH, J., GOULG, E.A., MEYERS, G., MONATH, T., MUERHOFF, S., PLETNEV, A., RICO-HESSE, R., SMITH, D.B., STAPLETON, J.T., and ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*, *Journal of General Virology*, 98:2–3. 2017.
- SLIWOSKI, G. et al. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, v. 66, n. 1, p. 334-395, 2013.
- SLON CAMPOS, J.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATION, G. The immune response against flaviviruses. *Nature Immunology*, v. 19, n. 11, p. 1189-1198, 2018.
- SMITH, K. et al. Infectious disease and economics: The case for considering multi-sectoral impacts. *One Health*, v. 7, p. 100080, 2019.
- STERLING, T.; IRWIN, J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 55, n. 11, p. 2324-2337, 2015.
- STRAATMANN, A. et al. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 6, p. 511-515, 1997.
- TAVARES-NETO, J. et al. Pesquisa de anticorpos para arbovírus no soro de residentes no povoado de Corte de Pedra, Valença, Bahia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 4, p. 351-358, 1986.
- TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. *Jornal Brasileiro de Economia da Saúde*, v. 9, n. 3, p. 267-276, 2017.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D506-D515, 2018.
- UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME (UNDP). Uma Avaliação do Impacto Socioeconômico do Vírus Zika na América Latina e Caribe: Brasil, Colômbia e Suriname como estudos de caso. 2017.
- VIANA, D.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 16, n. 2, p. 240-256, 2013.
- VILLORDO, S.; GAMARNIK, A. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Research*, v. 139, n. 2, p. 230-239, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). A brief guide to emerging infectious diseases and zoonoses. WHO Regional Office for South-East Asia, 2014.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases: report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 28 February to 4 March 1983] 1985.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The Control of Neglected Zoonotic Diseases: a route to poverty alleviation. Geneva: World Health Organization, 2006.
- WU, J. et al. Structure of the Flavivirus Helicase: Implications for Catalytic Activity, Protein Interactions, and Proteolytic Processing. *Journal of Virology*, v. 79, n. 16, p. 10268-10277, 2005.
- XIE, X. et al. Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *Journal of Virology*, v. 87, n. 8, p. 4609-4622, 2013.
- YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, v. 12, n. 1, p. 7-8, 2014.
- YORK, I.; STEVENS, J.; ALYMOVA, I. Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. *Bioscience Reports*, v. 39, n. 1, 2019.
- YOUNG, P. Arboviruses: A Family on the Move. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, p. 1-10, 2018.
- ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *British Journal of Pharmacology*, v. 175, n. 2, p. 181-191, 2017.

CURRÍCULO LATTES



João Pedro Nunes Sagini

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3864761714361788>

ID Lattes: **3864761714361788**

Última atualização do currículo em 08/08/2021

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atualmente é biomédico do setor de microbiologia e urinálise do Laboratório Unimed/Porto Alegre e do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul. Possui experiência e interesse nas áreas de microbiologia, bioquímica, programação metabólica, neurociências e biotecnologia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	João Pedro Nunes Sagini 
Nome em citações bibliográficas	SAGINI, JOÃO P.;SAGINI, JOÃO PEDRO
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/3864761714361788

Endereço

Endereço Profissional	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Departamento de Parasitologia e Microbiologia. Rua Sarmento Leite, 245 Centro Histórico 90050170 - Porto Alegre, RS - Brasil Telefone: (051) 33039000 Ramal: 8742
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2019 interrompida	Especialização interrompida em 2019 em Residência Multiprofissional em Saúde. (Carga Horária: 5760h). Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil. Bolsista do(a): Ministério da Educação, MEC, Brasil. Ano de interrupção: 2019
2015 - 2018	Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Resíduos agroindustriais de uva e arroz como fonte de compostos antibiofilme. Orientador: Karine Rigon Zimmer.

Formação Complementar

2018 - 2018	Curso de Biologia Estrutural. (Carga horária: 3h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2017 - 2017	II Escola de Verão PPGCF - Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos. (Carga horária: 30h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2017 - 2017	Curso de Atualização em Sepse. (Carga horária: 10h). Hospital Mãe de Deus, HMD, Brasil.
2016 - 2016	Extensão universitária em II Curso Teórico-Prático de Colheita de Sangue Venoso. (Carga horária: 4h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2016 - 2016	Curso de Técnicas Parasitológicas Aplicadas às Análises Clínicas. (Carga horária: 20h). Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Brasil.
2015 - 2015	VII Curso de Aplicações Clínicas da Bioquímica: Bioquímica do Esporte. (Carga horária: 9h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional
2014 - 2016

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Voluntário de iniciação científica no Laboratório de Programação Metabólica, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Trabalho com modelo experimental do Mal de Alzheimer em ratas Wistar e sua prole. Trabalho com modelo de programação metabólica com protocolo de exercício físico, análise de componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos encefálicos, estresse oxidativo, testes comportamentais e análise de dados. Além disso, vínculo voluntário em modelo de restrição calórica em ratas Wistar e sua prole com análise de componentes antioxidantes encefálicos.

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional
2018 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 20

Outras informações

Monitor da disciplina de Biotecnologia do curso de Biomedicina Noturno da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), responsável pelo auxílio em aulas práticas, orientação dos alunos e participação da elaboração de atividades teórico-práticas.

Vínculo institucional
2018 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: PID, Carga horária: 40

Outras informações

Bolsista do Programa de Iniciação à Docência (PID) voltado para o desenvolvimento de objetos didáticos e aprendizado em docência nas disciplinas de Metodologias Bioanalíticas para os cursos de Biomedicina e Biomedicina Noturno.

Vínculo institucional
2016 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

Outras informações

Estagiário no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), auxiliando no preparo e manejo de aulas práticas, além do desenvolvimento de atividades de iniciação científica no Laboratório de Cocos Gram Positivos e Microbiologia Molecular com pesquisa dos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*, além do desenvolvimento biotecnológico de compostos antibacterianos e antibiófilme de origem natural.

Vínculo institucional
2017 - 2017

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Membro Efetivo, Carga horária: 10

Outras informações

Membro Efetivo da Liga de Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (LIMT/UFCSPA).

Vínculo institucional
2017 - 2017

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 10

Outras informações

Monitor da disciplina de Métodos em Biologia Molecular do curso de Toxicologia Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), responsável pelo auxílio em aulas práticas, orientação dos alunos e participação da elaboração de atividades teórico-práticas.

Vínculo institucional
2016 - 2016

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 10

Outras informações

Monitor da disciplina de Parasitologia e Micologia do curso de Biomedicina Noturno da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), responsável pelo auxílio em aulas práticas, orientação dos alunos e participação da elaboração de atividades teórico-práticas, procedimentos operacionais padrão e protocolos.

Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, IC/FUC, Brasil.

Vínculo institucional
2019 - Atual

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Biomédico, Carga horária: 36

Outras informações

Biomédico atuante no setor de bioquímica e imunologia do Laboratório de Análises Clínicas.

Vínculo institucional
2018 - 2018

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário Curricular, Carga horária: 30

Outras informações

Estagiário do Laboratório de Análises Clínicas da Fundação Universitária de Cardiologia (FUC-IC), auxiliando nas áreas de Microbiologia Clínica, Bioquímica Clínica, Imunoquímica, Hematologia e Coagulação.

Regenera Biotecnologia, REGENERA, Brasil.

Vínculo institucional
2018 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional
2014 - 2016

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Voluntário de iniciação científica no Laboratório de Programação Metabólica, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Trabalho com modelo experimental do Mal de Alzheimer em ratas Wistar e sua prole. Trabalho com modelo de programação metabólica com protocolo de exercício físico, análise de componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos encefálicos, estresse oxidativo, testes comportamentais e análise de dados. Além disso, vínculo voluntário em modelo de restrição calórica em ratas Wistar e sua prole com análise de componentes antioxidantes encefálicos.

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional
2018 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 20

Outras informações

Monitor da disciplina de Biotecnologia do curso de Biomedicina Noturno da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), responsável pelo auxílio em aulas práticas, orientação dos alunos e participação da elaboração de atividades teórico-práticas.

Vínculo institucional
2018 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: PID, Carga horária: 40

Outras informações

Bolsista do Programa de Iniciação à Docência (PID) voltado para o desenvolvimento de objetos didáticos e aprendizado em docência nas disciplinas de Metodologias Bioanalíticas para os cursos de Biomedicina e Biomedicina Noturno.

Vínculo institucional
2016 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

Outras informações

Estagiário no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), auxiliando no preparo e manejo de aulas práticas, além do desenvolvimento de atividades de iniciação científica no Laboratório de Cocos Gram Positivos e Microbiologia Molecular com pesquisa dos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*, além do desenvolvimento biotecnológico de compostos antibacterianos e antibiofilme de origem natural.

Vínculo institucional
2017 - 2017

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Membro Efetivo, Carga horária: 10

Outras informações

Membro Efetivo da Liga de Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (LIMT/UFCSPA).

Vínculo institucional
2017 - 2017

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 10

Outras informações

Monitor da disciplina de Métodos em Biologia Molecular do curso de Toxicologia Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), responsável pelo auxílio em aulas práticas, orientação dos alunos e participação da elaboração de atividades teórico-práticas.

Vínculo institucional
2016 - 2016

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 10

Outras informações

Monitor da disciplina de Parasitologia e Micologia do curso de Biomedicina Noturno da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), responsável pelo auxílio em aulas práticas, orientação dos alunos e participação da elaboração de atividades teórico-práticas, procedimentos operacionais padrão e protocolos.

Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, IC/FUC, Brasil.

Vínculo institucional
2019 - Atual

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Biomédico, Carga horária: 36

Outras informações

Biomédico atuante no setor de bioquímica e imunologia do Laboratório de Análises Clínicas.

Vínculo institucional
2018 - 2018

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário Curricular, Carga horária: 30

Outras informações

Estagiário do Laboratório de Análises Clínicas da Fundação Universitária de Cardiologia (FUC-IC), auxiliando nas áreas de Microbiologia Clínica, Bioquímica Clínica, Imunoquímica, Hematologia e Coagulação.

Regenera Biotecnologia, REGENERA, Brasil.

Vínculo institucional
2018 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

Outras informações	Auxiliar em bioprocessos envolvendo produção de biomoléculas oriundas de micro-organismos marinhos com potencial econômico.
Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário, AGRONÔMICA, Brasil.	
Vínculo institucional 2018 - 2018	Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário Curricular, Carga horária: 30
Outras informações	Estagiário do Agrônômica - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário, auxiliando nas áreas de Herbologia, Entomologia, Bacteriologia, Biologia Molecular, Micologia e Nematologia.
Hospital Universitário - ULBRA, HU-ULBRA, Brasil.	
Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Biomédico Residente, Carga horária: 60, Regime: Dedicção exclusiva.
Outras informações	Biomédico Residente (R1) do Programa de Residência Multiprofissional em Saúde com ênfase em Saúde do Adulto e Idoso, atuando no Hospital Universitário da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) em uma perspectiva multidisciplinar dos Laboratórios de Análises Clínicas e Patologia.
Unimed, UNIMED, Brasil.	
Vínculo institucional 2021 - Atual	Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Biomédico, Carga horária: 180
Outras informações	Analista de Laboratório do setor de Microbiologia e Urinálise.

Projetos de pesquisa

2020 - Atual	VÍRUS ROCIO – ESTRATÉGIAS DE MODELAGEM E REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA UMA DOENÇA EMERGENTE NEGLIGENCIADA Descrição: Avaliação de candidatos para o reposicionamento de fármacos para o combate das infecções relacionadas ao vírus Rocio por meio de análise computacional, de modo a elucidar a estrutura das proteínas estruturais e não estruturais do vírus Rocio. Estabelecendo desta maneira, o(s) possível(is) alvo(s) molecular(es) e analisar virtualmente a interação de fármacos já disponíveis nas bases de dados integrando o mercado e o Sistema Único de Saúde brasileiro e identificar os possíveis candidatos frente ao tratamento deste arbovírus. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) . Integrantes: João Pedro Nunes Sagini - Integrante / Rodrigo Ligabue Braun - Coordenador.
2016 - Atual	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE COMPOSTOS ANTIBIOFILME E AVALIAÇÃO EM <i>Caenorhabditis elegans</i> Descrição: Identificação em resíduos do processamento de soja, arroz e uva compostos capazes de impedir a formação de biofilmes bacterianos, com avaliação em modelo biológico. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) . Integrantes: João Pedro Nunes Sagini - Integrante / Karine Rigon Zimmer - Coordenador / Rebeca Pereira Inhoque - Integrante.
2016 - Atual	COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA E ANTIBIOFILME DE OVOS DE ARTRÓPODES Descrição: Este projeto busca novos compostos com atividade antibiótica e antibiofilme em ovos de artrópodes. Prospecção de moléculas com aplicação biotecnológica na área da saúde e indústria de alimentos. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) . Integrantes: João Pedro Nunes Sagini - Coordenador / Karine Rigon Zimmer - Integrante / Adriana Seixas - Integrante / Alexandre José Macedo - Integrante / Carlos Termignoni - Integrante / Fernando Bueno Ferreira Fonseca de Fraga - Integrante.
2014 - 2018	AVALIAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO E DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE STREPTOCOCCUS PYOGENES DA CIDADE DE PORTO ALEGRE Descrição: Microorganismos da espécie <i>Streptococcus pyogenes</i> são patógenos estritamente humanos que são responsáveis por infecções que variam desde brandas até mais severas. Dentre as infecções mais brandas pode-se citar faringites e pioderma e como exemplo das infecções mais severas pode-se citar fascite necrotizante, síndrome do choque tóxico estreptocócico e glomerulonefrite pós-estreptocócica. O isolados bacterianos de S.

pyogenes são conhecidos por sua variedade de fatores de virulência, responsáveis por auxiliar o microrganismo durante a infecção. Um dos principais, mais estudados e que atualmente é considerado um marcador epidemiológico destes microrganismos é a Proteína M. Esta proteína é responsável principalmente por sua função no escape da fagocitose e na adesão da bactéria às células do hospedeiro. O sequenciamento do gene da porção hipervariável desta proteína é atualmente, o principal método de classificação destes microrganismos. Contudo, sabe-se que existe uma variação demográfica importante nos tipos mais prevalentes de proteína M, sendo estes tipos relacionados com diferentes regiões ao redor do mundo. Além disso, muitos outros fatores de virulência como a cápsula de ácido hialurônico secretada por estes isolados tem papel importante na invasão ao hospedeiro, tomando isolados que possuem uma maior expressão da cápsula, mais invasivos. Atualmente mais de 37 fatores de virulência são conhecidos para os microrganismos da espécie *S. pyogenes*, muitos deles com sua função ainda a ser desvendada completamente. No Brasil, poucos estudos são realizados com estes isolados, no Sul do Brasil estes dados são ainda mais raros. Neste trabalho serão avaliados 38 fatores de virulência de isolados clínicos de *S. pyogenes*, provenientes de 3 hospitais da cidade de Porto Alegre, RS. Para a Proteína M, será realizado o sequenciamento do gene que codifica esta proteína. A análise da expressão da cápsula de ácido hialurônico será avaliada para 3 isolados de diferentes sítios anatômicos (sangue, orofaringe e lesão de pele). O perfil genético destes isolados será avaliado quanto à sua clonalidade por PFGE e MLST. Por fim, será avaliado o perfil de resistência destes microrganismos frente aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Doutorado: (2) .

2014 - 2015

Integrantes: João Pedro Nunes Sagini - Integrante / Gustavo Enck Sambrano - Integrante / Thiago Galvão da Silva Palm - Integrante / Gustavo Peliccioli Riboldi - Integrante / Neidimar Tolfo - Integrante / Pedro Alves d'Azevedo - Coordenador.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA SOBRE PARÂMETROS DE ESTADO REDOX NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS A INTERVENÇÃO NUTRICIONAL NO PERÍODO FETAL.

Descrição: Avaliação da restrição calórica durante a prenhez de ratas Wistar sobre parâmetros do estado redox no sistema nervoso central a fim de demonstrar as alterações metabólicas e produção de radicais livres..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (3) / Mestrado acadêmico: (1) .

2014 - Atual

Integrantes: João Pedro Nunes Sagini - Integrante / SALOMON, TIAGO B. - Integrante / CRISTIANE MATTÉ - Coordenador / VINÍCIUS STONE - Integrante.

EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO COMO ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA EM UM MODELO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Descrição: Avaliação da capacidade neuroprotetora do exercício físico materno aeróbico (natação) durante a gestação em modelos in vivo e in vitro da doença de Alzheimer através de ensaios bioquímicos e comportamentais, verificando a viabilidade celular em culturas organotípicas, além de parâmetros mitocondriais, de estado redox e sinalização celular envolvidos..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Doutorado: (1) .

Integrantes: João Pedro Nunes Sagini - Integrante / KLEIN, CAROLINE P. - Integrante / MATTÉ, CRISTIANE - Coordenador / Christianne Gazzana Salbego - Integrante / BERNARDO GINDRI - Integrante.

Projetos de extensão

2018 - Atual

Objetos Didáticos para o Ensino da Disciplina de Metodologias Bioanalíticas

Descrição: Projeto do Programa de Iniciação à Docência (PID) voltado para o desenvolvimento de objetos didáticos e aprendizado em docência nas disciplinas de Metodologias Bioanalíticas para os cursos de Biomedicina Integral e Biomedicina Noturno.

Situação: Em andamento; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

2016 - 2016

Integrantes: João Pedro Nunes Sagini - Integrante / Sheila Bünecker Lecke - Coordenador.

Programa de Educação pelo Trabalho em Saúde (PET-Saúde)
Descrição: Programa de interação multidisciplinar com o intuito de promover a saúde, a educação e a segurança, diretamente nas Unidades de Estratégia de Saúde com os profissionais com caráter educativo e preventivo, através de palestras e atividades interacionistas..

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Integrantes: João Pedro Nunes Sagini - Coordenador / Claudia Giuliano Bica - Integrante.

Áreas de atuação

- | | |
|----|--|
| 1. | Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia. |
| 2. | Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica. |

Idiomas

Espanhol	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Italiano	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

- | | |
|------|--|
| 2018 | Destaque de sessão da IV Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA pelo trabalho de conclusão de curso, UFCSPA. |
|------|--|

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

- ★ KLEIN, CAROLINE PERES ; HOPPE, JULIANA BENDER ; SACCOMORI, ANDRÉ BRUM ; DOS SANTOS, BERNARDO GINDRI ; **SAGINI, JOÃO PEDRO** ; CRESTANI, MARIANA SCORTEGAGNA ; AUGUST, PAULINE MACIEL ; HÖZER, RÉGIS MATEUS ; GRINGS, MATEUS ; FARMEGGIANI, BELISA ; LEIPNITZ, GUILHIAN ; NAVAS, PLÁCIDO ; SALBEGO, CHRISTIANNE GAZZANA ; MATTÉ, CRISTIANE . Physical Exercise During Pregnancy Prevents Cognitive Impairment Induced by Amyloid- β in Adult Offspring Rats. *MOLECULAR NEUROBIOLOGY* **ICR**, v. 55, p. 1-17, 2018.
- ★ STONE, VINÍCIUS ; AUGUST, PAULINE M. ; STOCHER, DANIELA P. ; KLEIN, CAROLINE P. ; COUTO, PABLO R. G. ; SILVA, YASMINI D. ; **SAGINI, JOÃO P.** ; SALOMON, TIAGO B. ; BENFATO, MARA S. ; MATTÉ, CRISTIANE . Food restriction during pregnancy alters brain's antioxidant network in dams and their offspring. *Free Radical Research* **ICR**, v. 9, p. 1-33, 2016.

Citações: [WEB OF SCIENCE™](#) 6 | [SCOPUS](#) 1

Resumos publicados em anais de congressos

- KLEIN, CAROLINE P. ; HOPPE, J. B. ; **SAGINI, JOÃO P.** ; SACCOMORI, A. B. ; CRESTANI, M. S. ; HOZER, R. M. ; COUTO, PABLO R. G. ; SALBEGO, C. G. ; MATTE, C. . MATERNAL EXERCISE PROTECTS AGAINST MEMORY IMPAIRMENT ELICITED BY ABETAD IN IN ADULT OFFSPRING. In: XXX Encontro Anual da FeSBE, 2016, Foz do Iguaçu. Anais do Congresso, 2016, 2016.
- STONE, VINÍCIUS ; AUGUST, PAULINE M. ; STOCHER, DANIELA P. ; SILVA, YASMINI D. ; COUTO, PABLO R. G. ; MARCELINO, T. B. ; **SAGINI, JOÃO P.** ; SALOMON, TIAGO B. ; BENFATO, MARA S. ; MATTE, C. . CALORIC RESTRICTION IN PREGNANT WISTAR RATS MODULATES ANTIOXIDANT DEFENSES IN MOTHERS AND PUPS' CEREBELLUM. In: 9th IBRO World Congress on Neuroscience, 2015, Rio de Janeiro. Livro de resumos, 2015, 2015.
- SAGINI, JOÃO P.** ; STONE, V. ; AUGUST, PAULINE M. ; STOCHER, DANIELA P. ; SILVA, YASMINI D. ; COUTO, PABLO R. G. ; MARCELINO, T. B. ; SALOMON, TIAGO B. ; BENFATO, MARA S. ; MATTE, C. . BRAIN ANTIOXIDANT NETWORK WAS AFFECTED BY CALORIC RESTRICTION TREATMENT ON PREGNANT WISTAR RATS AND ITS OFFSPRING. In: 9th IBRO World Congress on Neuroscience, 2015, Rio de Janeiro. Livro de Resumos, 2015, 2015.

Apresentações de Trabalho

- SAGINI, JOÃO P.**. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE UVA (*Vitis vinifera*) E ARROZ (*Oryza sativa*): POTENCIAL FONTE DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS E ANTIBIOFILME. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- SAGINI, JOÃO P.**. DINÂMICAS TEÓRICO-PRÁTICAS PARA O ENSINO DA DISCIPLINA DE METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- SAGINI, JOÃO P.**. PROTÓTIPOS DE ESPECTRÔMETROS DE MASSAS PARA APRENDIZAGEM EM METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. IV Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE UVA (*Vitis vinifera*) E ARROZ (*Oryza sativa*): POTENCIAL FONTE DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS E ANTIBIOFILME. 2018. (Outra).
2. VII Encontro do Serviço de Epidemiologia e Gerenciamento de de Riscos - SEGER. 2017. (Seminário).
3. XI Jornada do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar - SCIH. 2017. (Seminário).
4. Feira de Saúde. 2016. (Feira).
5. II Jornada de Hematologia e I Jornada Multidisciplinar do Serviço de Terapia Hematológica. 2016. (Simpósio).
6. I Jornada da Liga do Sangue. 2016. (Seminário).
7. Jornada Acadêmica de Biomedicina. 2016. (Simpósio).
8. Museu de Anatomia. 2016. (Exposição).
9. 9th IBRO World Congress on Neuroscience. BRAIN ANTIOXIDANT NETWORK WAS AFFECTED BY CALORIC RESTRICTION TREATMENT ON PREGNANT WISTAR RATS AND ITS OFFSPRING. 2015. (Congresso).
10. I Mostra de Trabalhos, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciên.. 2015. (Simpósio).