

**Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos**

**XII Semana Integrada do Instituto de
Física de São Carlos**

Livro de Resumos

**São Carlos
2022**

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos

SIFSC 12

Coordenadores

Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior

Diretor do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Javier Alcides Ellena

Presidente da Comissão de Pós Graduação do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Tereza Cristina da Rocha Mendes

Presidente da Comissão de Graduação do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo

Comissão Organizadora

Adonai Hilario

Arthur Deponte Zutião

Elisa Goettems

Gabriel dos Santos Araujo Pinto

Henrique Castro Rodrigues

Jefter Santiago Mares

João Victor Pimenta

Julia Martins Simão

Letícia Martinelli

Lorany Vitoria dos Santos Barbosa

Lucas Rafael Oliveira Santos Eugênio

Natasha Mezzacappo

Paulina Ferreira

Vinícius Pereira Pinto

Willian dos Santos Ribela

Normalização e revisão – SBI/IFSC

Ana Mara Marques da Cunha Prado

Maria Cristina Cavarette Dziabas

Maria Neusa de Aguiar Azevedo

Sabrina di Salvo Mastrandiono

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Informação do IFSC

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos

(12: 10 out. - 14 out. : 2022: São Carlos, SP.)

Livro de resumos da XII Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos/ Organizado por Adonai Hilario [et al.]. São Carlos: IFSC, 2022.

446 p.

Texto em português.

1. Física. I. Hilario, Adonai, org. II. Titulo

ISBN: 978-65-993449-5-4

CDD: 530

IC78

Expressão e purificação do complexo ZIKV NS2B-NS3 protease para triagem de candidatos antivirais

DOLCI, Isabela; NOSKE, Gabriela Dias; SILVA, Ellen Sousa; FERNANDES, Rafaela; OLIVA, Glaucius
isabela@estudante.ufscar.br

O vírus Zika (ZIKV) é o agente causador da febre zika, uma doença transmitida por mosquitos que se tornou um problema de saúde pública em 2015/2016 nas Américas e principalmente no Brasil, onde estava relacionado com os casos de microcefalia e síndrome de Guillain-Barré. O potencial do vírus para reaparecer causando novas epidemias está sempre latente e, por conseguinte, há uma necessidade urgente de descoberta e desenvolvimento de tratamentos específicos contra a infecção viral, uma vez que ainda não existem vacinas ou antivirais disponíveis. Os ensaios baseados em enzimas virais são estratégias úteis para testar grandes bibliotecas de compostos para inibidores de ZIKV. O domínio da protease NS3, que requer NS2B como seu co-fator, é responsável pela clivagem da poliproteína viral imatura nas proteínas NS maduras, representando assim um alvo interessante para o desenvolvimento de medicamentos. (1) O objetivo deste trabalho foi expressar, purificar e validar a atividade da protease recombinante da protease de Zika Vírus, ZIKV NS2B-NS3pro, para utilizá-la como alvo na busca de antivirais, por meio da avaliação de grandes bibliotecas de compostos em ensaios de atividade enzimática. (2) Para a obtenção da protease recombinante de ZIKV, foi utilizada uma construção contendo os resíduos 45-96 do cofator NS2B ligados covalentemente aos resíduos 1-177 do domínio protease da NS3 por um linker rico em glicina [G4SG4]. O plasmídeo utilizado, denominado gZIPro, contém ainda, uma região codificante para uma cauda 6xHIS-tag e proteína de fusão SUMO ambos na porção N-terminal da proteína de interesse2. A enzima foi expressa em bactéria e purificada por meio de cromatografia de níquel-afinidade e cromatografia de exclusão molecular. O ensaio enzimático consistiu em medir a fluorescência liberada pelo substrato BZ-NKRR-AMC quando ocorre a clivagem deste pela proteína. A reação foi montada em placas de 384 poços, em tampão de reação, contendo 5 nM da NS2B-NS3pro e 10 µM de Aprotinina, após 15 min de incubação à 37°C, a reação foi iniciada com adição de substrato em uma concentração final de 30 µM. DMSO 1% foi utilizado como controle negativo. A enzima foi obtida conforme descrito e os resultados das etapas de purificação foram analisados por SDS-PAGE. A proteína foi obtida na 1^a afinidade com tamanho esperado (29 kDa), separada da SUMO-6xHIS-tag por diálise e ao final da cromatografia de exclusão molecular, a NS2B-NS3pro foi obtida com pureza adequada e um elevado rendimento final de aproximadamente 9 mg de proteína por litro de cultura bacteriana. A proteína purificada teve sua atividade avaliada, constatando ser ativa e capaz de clivar o substrato peptídico, atingindo níveis de fluorescência de 20.000 mAU. A atividade da aprotinina foi validada como inibidor, mostrando-se altamente eficaz em inibir a atividade proteolítica da enzima, mantendo os níveis de leitura próximos de 0. A protease recombinante de ZIKV foi expressa e purificada com rendimento suficiente para os ensaios subsequentes. Sua atividade foi validada com o substrato peptídico e o inibidor Aprotinina, dessa forma, validando o ensaio enzimático que será utilizado nas triagens de alta performance para avaliação de grandes bibliotecas de moléculas.

Palavras-chave: Zika. Descoberta de drogas. Protease.

Agência de fomento: FAPESP (2021/01686-0)

Referências:

- 1 FERNANDES, R. S. *et al.* High-throughput antiviral assays to screen for inhibitors of Zika virus replication. **Journal of Visualized Experiments**, n. 176, p. e62422, 2021. DOI: 10.3791/62422.
- 2 PHOO, W. W. *et al.* Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2016.