



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ICF

QUÍMICA MEDICINAL DO EBOLA VÍRUS

Maceió - AL

2020

LUIZ PAULO DA SILVA

QUÍMICA MEDICINAL DO EBOLA VÍRUS

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Farmácia apresentado ao Instituto de Ciências Farmacêuticas – ICF, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof.Dr. Edeildo Ferreira Silva Júnior

Maceió - AL

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586q Silva, Luiz Paulo da.
Química medicinal do Ébola vírus / Luiz Paulo da Silva. – 2020.
51 f. : il.

Orientador: Edeildo Ferreira Silva Júnior.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 47-51.

1. Ebolavírus - Inibidores específicos. 2. Química medicinal. 3. Síntese de RNA. 4.
Produtos naturais. 5. Vacinas virais. I. Título.

CDU: 615.281.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Maceió, 19 de outubro de 2020.

Declaração

DECLARO, para os devidos fins, que o Trabalho de Conclusão de Curso do estudante LUIZ PAULO DA SILVA, intitulado "Química Medicinal do Ebola Vírus", foi apresentado no dia 12 de Junho de 2020 no Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas. O trabalho foi realizado sob orientação do docente EDEILDO FERREIRA SILVA JÚNIOR e teve como banca examinadora:

TITULARES:

Paulo Fernando da Silva Santos Júnior – UFAL

Igor José dos Santos Nascimento – ICF/UFAL

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, reading "Alfredo", written over a horizontal line.

Prof. Dr. Alfredo Dias de Oliveira Filho

Coordenador de TCC – Curso de Farmácia

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior pela dedicação e paciência durante a elaboração desse trabalho.

Ao meu Pai, pelo apoio em vários aspectos, sem o qual não seria possível concluir minha graduação e à Thamires pelo apoio como amiga e profissional.

RESUMO

O Ebola é um vírus da família *Filoviridae*, que inclui outros 6 tipos de Ebola vírus (EBOV). No entanto, os mais epidemiologicamente relevantes são o *Zaire* e o *Sudan ebola* vírus. Ambos foram identificados em 1976 na região de Zaire e no Sudão, em surtos caracterizados pela febre hemorrágica, além de febre, dor de cabeça, fraqueza, náuseas, entre outros sintomas que os tornavam difícil de distinguir inicialmente de outras viroses comuns. A transmissão pode ocorrer através do contato com fluidos corporais humanos contaminados, durante o período sintomático de indivíduos infectados. A ocorrência do EBOV no mundo, desde sua aparição, é caracterizada por casos isolados, sendo endêmico em alguns países africanos em função da cultura e de suas características zoonóticas, onde a taxa de mortalidade pode ser bastante elevada, em alguns casos, chegando a 90%. O EBOV é composto por 7 proteínas estruturais e duas não estruturais, com funções específicas em relação à patogenicidade, evasão do sistema imune e à replicação. O presente trabalho visou reunir estudos sobre o combate à febre hemorrágica causada pelo EBOV, por meio da busca em bancos de dados acadêmicos e científicos, como o "*Science Direct*", "*PubMed*", "*Scifinder*" entre outros, coletando trabalhos publicados desde 1977 até 2020. Como resultado, o correspondente trabalho destaca 30 compostos voltados ao combate da febre hemorrágica do EBOV, dentre estes, compostos de origem natural e sintética, com e sem alvo específico. Ainda, compostos de origem sintética têm sido mais estudados, onde estes podem atuar como inibidores da glicoproteína (GP) e da síntese de RNA do EBOV. Em adição, estratégias genéticas tem se destacado como um método mais promissor para o tratamento do EBOV, sendo responsável pelo surgimento da vacina rVSV-ZEBOV, desenvolvida pela *Jhonson&Jhonson*[®]. Por fim, o respectivo trabalho representa uma compilação de estudos voltados para o desenvolvimento de compostos e outras estratégias imunológicas contra o EBOV, a partir da ótica da química medicinal, cujo poderá ser utilizado para fomentar pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos compostos mais promissores no futuro.

Palavras-chave:EBOV; química medicinal; inibidores específicos; síntese; produtos naturais; vacinas.

ABSTRACT

Ebola is a virus from the *Filoviridae* family, which includes 6 other types of Ebola virus (EBOV), however, the most epidemiologically relevant are *Zaire ebola* and *Sudan ebola* viruses. Both of them were identified in 1976 in Zaire and Sudan regions, in outbreaks characterized by hemorrhagic fever, in addition to fever, headache, weakness, nausea, among other symptoms which make it difficult to initially distinguish from other common viruses. The transmission can occur by contact with contaminated human body fluids, during the symptomatic period of infected individuals. The occurrence of EBOV in the world, since its appearance, is characterized by isolated cases, being endemic in some African countries due to the culture and its zoonotic characteristics, where the mortality rate can be quite high, in some cases, reaching 90%. EBOV is composed of 7 structural and two non-structural proteins, with specific functions in relation to pathogenicity, evasion of the immune system, and replication. This work aimed to collect studies on the fight against hemorrhagic fever caused by EBOV, by searching in academic and scientific databases, such as "*Science Direct*", "*PubMed*", "*Scifinder*" among others, collecting works published from 1977 to 2020. As a result, the corresponding work highlights 30 compounds aimed at fighting EBOV hemorrhagic fever, among them, compounds from natural and synthetic origin, with and without a specific target. Also, compounds from synthetic origin have been more studied, where these can act as inhibitors of EBOV glycoprotein (GP) and RNA synthesis. In addition, genetic strategies have stood out as a more promising method for the treatment of EBOV, being responsible for the emergence of the rVSV-ZEBOV vaccine, developed by *Jhonson & Jhonson*[®]. Finally, this work represents a compilation of studies focused on the development of compounds and other immunological strategies against EBOV, from the medicinal chemistry perspective, which can be used to foment researches aiming the development of more promising new compounds in the future.

Keywords:EBOV; medicinal chemistry; specific inhibitors; synthesis; natural products; vaccines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Estrutura do Ebola vírus.	13
Figura 2– Distribuição geográfica de casos de Ebola vírus no ano de 2014.	16
Figura 3– Ciclo biológico do Ebola vírus.	19
Figura 4– Dipeptídeo de piperazina adamantano ativo frente ao receptor NPC1 do EBOV.	25
Figura 5 – Estrutura química do derivado diazachryseno.	26
Figura 6 – Estrutura química do remdesivir (GS-5734), um monofosforamidato inibidor da proteína L.	27
Figura 7 – Estrutura química do 6'-Fluoro-3-deazaneplanocina.	27
Figura 8 – Estrutura química do 3-deazaneplanocina A.	28
Figura 9 – Estrutura química do composto SW456.	29
Figuras 10 – Estruturas químicas do favipiravir	29
Figura 11 – Estruturas químicas dos compostos isoxazol C-5 substituído (A) e 1,2,3-Triazol C-1 substituído (B) e 5-(dietilamino)acetoamida.	30
Figura 12 – Estrutura química do composto toremifeno (A) e ibuprofeno (B).	31
Figura 13 – Estrutura química do aduto de hexakis de 60 fulerenos contendo 120 unidades de carboidratos periféricos	32
Figura 14 – Estrutura química do composto 3,5-dissubstituído-pirrol[2,3- <i>b</i>]piridina.	33
Figura 15 – Estrutura química do 1,7-DAAC	34
Figura 16 – Estruturas químicas dos compostos CM-10-18 (A) e seus derivados, IHVR11029 (B), IHVR17028 (C) e IHVRV19029 (D).	35
Figura 17 – Exemplo de modulador seletivo de receptores de estrogênio, Tamoxifeno	35
Figura 18 – Estrutura química do composto cp19	36
Figura 19 – Estrutura química da licochalcona (A) e do ácido 18- β -glicirrhético (B).	37
Figura 20 – Estrutura química do silvestrol.	37
Figura 21 – Estrutura química da Emetina.	38
Figura 22 – Estrutura tridimensional da Cianovirina-N (CV-N) em complexo com dímeros de manose.	39

Figura 23 – Estrutura química do composto chondramida (A) e noricumazol (B)	39
Figura 24 – Estrutura química do composto FGI-106	41
Figura 25 – Estrutura química do composto NSC 62914	42
Figura 26 – Estrutura química do composto Vimblastina	42
Figura 27 – Estrutura química da polietilenimina polímero de manose	44
Figura 28 – Estrutura química do brincidofovir.	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1	Ebola Vírus - EBOV	12
2.1.1	Estrutura e genética do ebola vírus	12
2.2	Epidemiologia do Ebola	14
2.3	Sintomatologia e Transmissão do Ebola	16
2.5	Ciclo de Infecção do EBOV	18
2.5	Diagnóstico	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos Específicos	22
4	MÉTODOS	23
4.1	Revisão Bibliográfica	23
4.2	Palavras-chaves Utilizadas	23
4.3	Ferramentas de Busca Utilizadas	23
4.4	CrITÉrios de Inclusão/Exclusão	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1	Inibidores Específicos de Alvos do Ebola Vírus	25
5.1.1	Inibidores de origem sintética.....	25
5.1.1.1	Inibidores da NPC1.....	25
5.1.1.2	Inibidores da proteína L.....	26
5.1.1.3	Inibidores da síntese de RNA viral.....	27
5.1.1.4	Inibidores da proteína GP	30
5.1.1.5	Inibidores da AP2 associada à proteína quinase 1 (AAK1).....	32
5.1.1.6	Inibidores do brotamento e montagem viral	33
5.1.1.7	Inibidores da α -glicosedase do retículo endoplasmático	34
5.1.1.8	Moduladores seletivos de receptores de estrogênio.....	35
5.1.1.9	Reposicionamento de Anti-histamínicos	35
5.2	Inibidores de Origem Natural	36
5.2.1.	Inibidores da nucleoproteína (NP).....	36
5.2.2.	Inibidores da RNA-helicaseFA4.....	37
5.3	Desenvolvimento de Vacinas	40

5.4	Inibidores Sem Alvos Específicos.....	40
5.5	Estratégia Genética	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O Ebola vírus (EBOV) é um vírus pertencente à família *Filoviridae* responsável por causar a febre hemorrágica do ebola, uma condição fatal que acomete os pacientes mais graves (CLÉMENT; ADHIKARI; LAMONTAGNE, 2019). Dentro do gênero *Ebolavirus* existem seis subtipos: *Zaire ebolavirus*; *Sudan ebolavirus*; *Tai Forest ebolavirus*; *Bundibugyo ebolavirus*; *Reston ebolavirus* e *Bombali ebolavirus*. Entretanto, os subtipos mais relevantes epidemiologicamente são os subtipos *Sudan ebolavirus* e *Zaire ebolavirus*, uma vez que causam problemas mais severos (ALMEIDA, 2015; BROWN; MEPHAM; SHORTEN, 2017).

As manifestações clínicas da doença causada por EBOV surgem entre 2 e 21 dias após a infecção, tendo uma média de duração de 8 a 10 dias. Basicamente, os sintomas compreendem febre, dores, fadiga, vômito e diarreia, além de hemorragias, hematomas, sangramentos e dor de cabeça severa (WONG; WONG, 2015). Os primeiros surtos ocasionados por EBOV datam de 1976, em Zaire e no Sudão, onde foram registrados, respectivamente, 318 e 280 casos, com taxas de mortalidade de 88 e 53%. Desde então, alguns países da África sofrem com o reaparecimento da doença em vários surtos em função da cultura e da característica zoonótica desta (BROWN; MEPHAM; SHORTEN, 2017). Após o surto de 1976, ocorreram vários outros, com destaque aos períodos de 1995, 2000 e 2007, onde foram registradas respectivamente 254, 224, 229 mortes por EBOV em Uganda e na República Democrática do Congo. Em 2014, foram registradas 11.308 mortes por EBOV em um surto epidêmico no Oeste Africano. Além desses surtos, foram registrados apenas casos pontuais em outros países, alguns com infecções assintomáticas causadas pelo subtipo *Reston ebolavirus* (SHEARS; O'DEMPSEY, 2015).

Fora do continente africano foram reportados poucos e breves casos de infecção por EBOV. Nos EUA foram relatados 3 casos do *Reston ebolavirus* entre 1989 e 1996. Ainda, foram registrados 4 casos e nenhuma morte em instalações de quarentena. Entre 2014-2016 foram registrados 4 casos e 1 morte por *Zaire ebolavirus* nos EUA dado o tráfego de pessoas doentes de áreas endêmicas. No Reino Unido dois casos foram registrados, um por acidente laboratorial e outro importado por profissional da saúde. Na Rússia ocorreram dois casos, um em 1996 e outro em 2004, por acidente laboratorial onde os dois pesquisadores vieram a óbito. Três casos ocorrerem nas Filipinas por *Reston ebolavirus* e um caso em Cote D'ivoire, onde foi registrada a primeira ocorrência por *Tai Forest*

ebolavirus, ambos os casos sem mortes (JAHRLING et al., 1990; MEDICAL, 1977; MIRANDA et al., 1999; WHO, 2009).

O EBOV é composto por basicamente sete proteínas, dentre elas a *Nucleoproteína* (NP), *Proteínas Virais 24, 30, 35 e 40* (VP24, 30, VP35 e VP40), *Glicoproteína* (GP) e *RNA replicase* (L) (ALMEIDA, 2015; MADELAIN et al., 2016). A compreensão da estrutura do vírus é fundamental para elucidar mecanismos de patogenicidade e replicação viral, desta forma, o planejamento de novos fármacos para tratar a doença torna-se factível. Estão sendo desenvolvidos fármacos que afetam os meios patogênicos e de replicação do vírus atingindo-o em diferentes etapas, tais como ligação à superfície celular de células susceptíveis, replicação, montagem e/ou brotamento.

Pesquisadores, em busca de meios de tratamento tanto do EBOV quanto qualquer outro patógeno, têm utilizado diversos meios de descoberta de tratamentos mais eficazes. A abordagem computacional é um meio pelo qual é simulado os estados dos átomos e moléculas referentes à droga e o patógeno ou célula, onde a simulação dá ao pesquisador uma perspectiva do seu potencial terapêutico. Além da abordagem computacional, se busca também um potencial terapêutico dentre compostos naturais e sintéticos, através de processos de triagem. Uma vez que uma molécula tem seu potencial terapêutico apreciado, essa mesma molécula pode ser modificada de forma que tenha sua farmacocinética e farmacodinâmica melhorada (LAVECCHIA; GIOVANNI, 2013). Apesar disso, como na maioria das infecções virais, a estratégia imunológica representa um meio mais efetivo de combate ao EBOV. Atualmente, o tratamento para EBOV mais promissor é baseado na vacina rVSV-ZEBOV, apesar dos vários medicamentos e moléculas reportadas, essa encontra-se mais avançada em estudos clínicos (JUAN-GINER et al., 2019).

Diante do exposto, este trabalho de conclusão de curso busca demonstrar a importância de estudos de química medicinal no planejamento e descoberta de compostos ativos frente ao EBOV. Ainda, esse apresenta uma profunda revisão da literatura acerca de estudos envolvendo compostos naturais, sintéticos, com alvos específicos e sem alvos definidos, e imunologia, além de contemplar a estrutura do vírus e seus mecanismos infecciosos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Ebola Vírus - EBOV

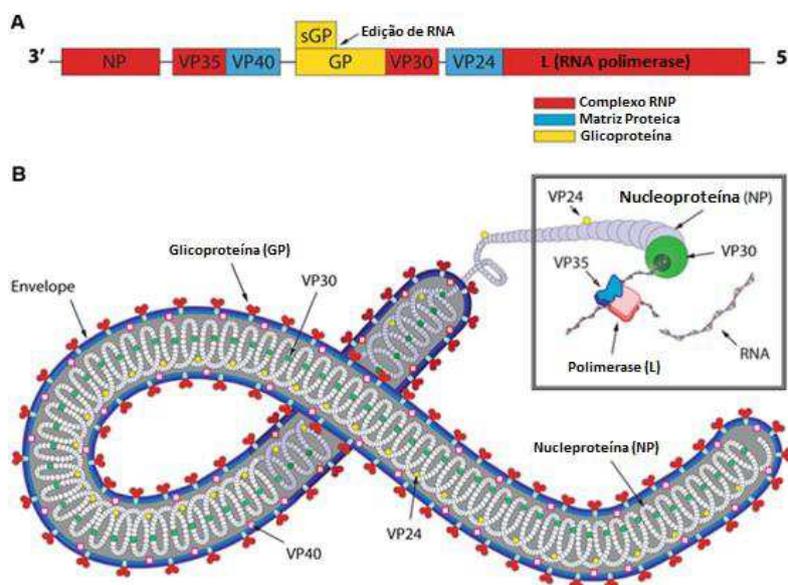
O EBOV é transmitido através do contato com fluidos biológicos de seres humanos ou outros mamíferos infectados, caracterizando-o como uma zoonose com aparecimentos repentinos, relacionada a altos índices de mortalidade (BROWN; MEPHAM; SHORTEN, 2017; MOGHADAM et al., 2015). Inicialmente, os indivíduos infectados não apresentam sintomas, uma vez que o período de incubação do EBOV pode variar entre 2 e 21 dias, após a exposição. Entretanto, os sintomas não específicos da doença podem rapidamente evoluir para a forma mais grave da doença, causando a morte em mais de 50% dos casos sintomáticos (WONG; WONG, 2015). Dessa forma, o EBOV é extremamente ameaçador, uma vez que o índice de mortalidade pode chegar até 90%, como foi reportado no surto em Zaire (província de Angola), no ano de 1976 (BURKE; DECLERQ; GHYSEBRECHTS, 1978).

O EBOV é um agente biológico que exige biossegurança nível 4, pois é resistente ao congelamento e à ação de desinfetantes (p.ex.: hipoclorito de sódio), detergentes e fenóis, podendo sobreviver em materiais líquidos e secos, por vários dias. Entretanto, pode ser inativado por meio de radiação gama ou tratamento térmico utilizando-se 60°C por 1 hora ou 75°C por 30 minutos. Em contraste, o tratamento de inativação frequentemente utilizado, empregando-se 56°C por 30 minutos, pode não ser seguramente eficaz (WONG; WONG, 2015).

2.1.1 Estrutura e genética do ebola vírus

O EBOV é um vírus envelopado e não segmentado, que possui uma fita simples de RNA negativa, (-)ssRNA. Ainda, seu genoma codifica sete proteínas estruturais e duas glicoproteínas não-estruturais. Dentre as proteínas estruturais codificadas pelo o genoma filoviral do EBOV estão anucleoproteína (NP), as proteínas estruturais virais 24 (VP24), 30 (VP30), 35 (VP35) e 40 (VP40), a glicoproteína (GP), e a RNA-polimerase RNA-dependente(L) (Figura 1) (ALMEIDA, 2015; MADELAIN et al., 2016). Já as proteínas não-estruturais são produtos primários do gene codificador da GP, que gera a glicoproteína solúvel (sGP, ou GP1) e a pequena glicoproteína solúvel (ssGP, ou GP2) (MEHEDI et al., 2011).

Figura 1 - Estrutura do Ebola vírus.



Fonte: BIODRUGS, 2013 (tradução).

O termo filovírus refere-se a uma característica particular a tais vírus, uma vez que são filamentosos, com diâmetro aproximado de 80 nm e comprimento variável, entre 800 nm e 14 μ m. Estes podem ter aspecto de filamentos ramificados e curtos, em formato de “U” ou circular, possuindo uma massa de aproximadamente 90 kb (ALMEIDA, 2015).

As proteínas NP, VP35 e VP40 compõem o nucleocapsídeo do EBOV, estando a NP possivelmente associada ao mecanismo de virulência; a VP35 age como antagonista de interferon tipo 1 (INF-1); e a VP40 é responsável pela integridade estrutural da partícula viral. Já as glicoproteínas, proteínas transmembranares que se ligam aos receptores de superfície na membrana plasmática da célula do hospedeiro, atuam no processo de endocitose do vírus e induzem à formação de citocinas, contribuindo para resistência à resposta imune do hospedeiro (FALASCA et al., 2015).

Dadas as diferenças genômicas entres os subtipos *Reston ebolavirus* (EBO-R) e *Zaire ebolavirus* (EBO-Z), Ikegami e colaboradores (2001), através do estudo da sequência genética do subtipo *Reston*, sugeriram que poderia haver diferenças no mecanismo de infecção em função da proteína GP (IKEGAMI et al., 2001), como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação de sinais transcricionais conservados e regiões intergênicas do *Reston ebolavirus* (EBO-R) e *Zaire ebolavirus* (EBO-Z).

	EBO-R, 1996 (Filipinas)	EBO-Z, 1976 (Zaire)
NP–Sinal de início	CUCCUUCUAAAU UAAUUCUUUUU	CUCCUUCUAAAU UAAUUCUUUUU
NP–Sinal de parada intergênico	GUAAA	GAUUA
VP24–Sinal de início	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU
VP24–Sinal de parada intergênico	*	CGGA
VP30–Sinal de início	CUGCUUCUAAAU UAAUUCUUUUU	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU
VP30–Sinal de parada intergênico	AGU-(N)124-GUC	GAC-(N)137-UUA
VP35 – Sinal de início	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU
VP35 – Sinal de parada intergênico	*	*
VP40 – Sinal de início	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU
VP40 – Sinal de parada intergênico	CUAUAUG	AGCCG
GP – Sinal de início	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU	CUACUUCUAAAU UAAUUCUUUUU
GP – Sinal de parada intergênico	GAAUA	*
L – Sinal de início	CUCCUUCUAAAU	CUCCUUCUAAAU
L – Sinal de parada intergênico	UAAUAUUUUUU	UAAUAUUUUUU

Fonte: Autor, 2020. * = Sem região intergênica detectada em função do “overlap”.

2.2 Epidemiologia do Ebola

Em 1976, o EBOV foi identificado pela primeira em seres humanos, após o primeiro surto ocorrido no Sudão e, ao mesmo tempo, na República Democrática do Congo (BROWN; MEPHAM; SHORTEN, 2017). No entanto, verificou-se que não havia conexão entre ambos os surtos. Além disso, duas espécies distintas de filovírus, denominadas *Zaire ebolavirus* e *Sudan ebolavirus* foram identificadas como responsáveis por tais surtos. Dentre os afetados, profissionais da área de saúde, os quais contribuíram para uma infecção nosocomial (adquirida no hospital) disseminada, amplificando a

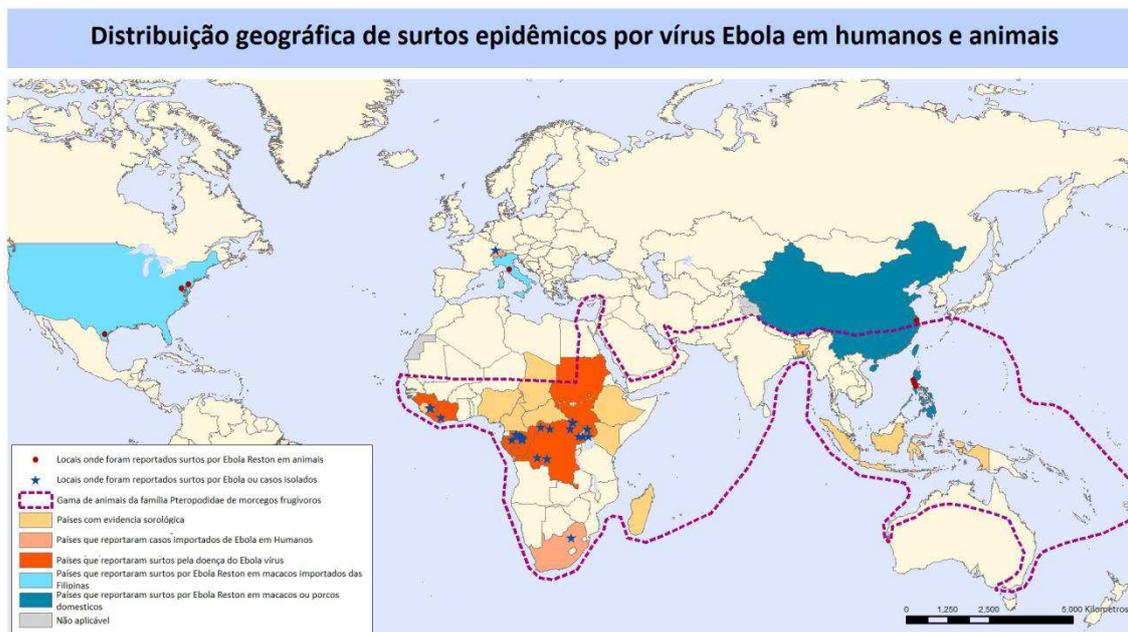
disseminação da doença em diferentes comunidades afetadas, durante o tratamento de pacientes (BURKE; DECLERQ; GHYSEBRECHTS, 1978; SHEARS; O'DEMPSEY, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1996). Tal ocorrido estava associado ao fato dos sintomas serem inicialmente inespecíficos e, além disso, ainda não se tinha conhecimento do EBOV, bem como de sua transmissão por fluidos corporais (BROWN; MEPHAM; SHORTEN, 2017).

Em geral, dois fatores principais foram observados nestas áreas acometidas, os quais estavam diretamente relacionados à disseminação do EBOV, sendo estes a infraestrutura precária e a falta de recursos financeiros para o isolamento adequado e efetivo dos pacientes (TRONCOSO, 2015). Dessa forma, tais surtos atingiram uma taxa de mortalidade de 90% (BURKE; DECLERQ; GHYSEBRECHTS, 1978).

Em 2014, o surto de ebola mais impactante da história ocorreu, inicialmente, em Guiné, Serra Leoa e na Libéria (Figura 2). Segundo Shearse O'Dempsey (2015) e Bell (2016), este surto ocorreu devido a vários fatores, dentre eles a ampla disseminação geográfica dos casos; resposta tardia da comunidade internacional; mobilidade de populações; transmissão do vírus em áreas urbanas densamente povoadas; condições precárias de saúde pública e infraestrutura social; falta de conhecimento sobre a doença; e descrença total na existência do EBOV, por parte das autoridades governamentais e até de profissionais da saúde.

Em 1º de Agosto de 2018, o ministro da saúde da República Democrática do Congo reportou um surto por EBOV nas províncias de Ituri e Kivu Sul que persiste ainda em 2020 (WHO, 2020). Segundo a OMS, esse é o 10º surto causado por EBOV, sendo o segundo maior surto já registrado desde 1976.

Figura 2 - Distribuição geográfica de casos de Ebola vírus no ano de 2014.



Fonte: WHO, 2014. Legenda: Ponto laranja = Locais onde foram reportados surtos por *Ebola Reston* em animais; Estrela azul = Locais onde foram reportados surtos por Ebola ou casos isolados; Pontilhado lilás = Gama de animais da família *Pteroptidae* ou morcegos frugívoros; Área amarela = Países com evidência sorológica; Área bege = Países que reportaram casos de Ebola importados em humanos; Área laranja = Países que reportaram casos surtos da doença por Ebola vírus; Área azul-claro = Países que reportaram surtos por *Ebola Reston* em macacos importados das Filipinas; Área azul-escura = Países que reportaram surtos por Ebola vírus em macacos ou porcos domésticos; Área cinza = Não aplicável.

2.3 Sintomatologia e Transmissão do Ebola

Os sintomas podem aparecer após um período de incubação de 2 a 21 dias após a infecção, sendo transmissível a partir do momento do aparecimento dos sintomas (WONG; WONG, 2015). Inicialmente, os sintomas são inespecíficos (fase aguda) e podem se apresentar como febre, dor de cabeça, artralgia, mialgia, fraqueza e náuseas, os quais facilmente podem ser confundidos com sintomas comuns de outras viroses mais simples. Apesar da ocorrência de febre ser comum em pacientes infectados por EBOV, aproximadamente 18% destes apresenta (REWAR; MIRDHA, 2014; SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA; RAMASAMY, 2015).

Na fase aguda, a doença pode não apresentar resposta ao tratamento com antimaláricos e antibióticos. Em aproximadamente dois dias após a fase aguda, uma aparente melhora do paciente pode ser verificada, podendo este, em alguns casos, se recuperar e sobreviver à doença. No entanto, caso isso não aconteça, o quadro pode se

agravar e surgir mais sintomas, tais como petéquias (manchas roxas na pele), distúrbios respiratórios, soluços, dor no peito e garganta, dispnéia, além de disfunções cardiovasculares e até choque hipovolêmico (REWAR; MIRDHA, 2014). Entre 10 e 30% dos infectados apresentam sangramento, podendo ser diarreia hemorrágica, sangramento no local da punção, sangramento de nariz e gengivas. Por fim, a forma mais agressiva da doença se apresenta como um quadro de hemorragia severa, cujo acomete uma pequena proporção dos pacientes infectados (CLÉMENT; ADHIKARI; LAMONTAGNE, 2019; TRONCOSO, 2015).

A transmissão ocorre basicamente pelo contato com animais infectados ou por fluidos corporais humanos, tais como urina, saliva, suor, sêmen e fezes. Embora, a transmissão por objetos contaminados com fluidos também seja possível. Dentre os animais silvestres mais comumente relacionados à transmissão do EBOV, os morcegos frugívoros e primatas não-humanos recebem maior destaque (REWAR; MIRDHA, 2014).

O ponto crítico na transmissão entre seres humanos se dá durante o estágio agudo da doença, quando todos os fluidos corporais do paciente são infectantes. Desse modo, os familiares têm um alto risco de serem contaminados, sendo que o vírus persiste por várias horas após a morte do hospedeiro (BROWN; MEPHAM; SHORTEN, 2017; MOGHADAM et al., 2015; TRONCOSO, 2015).

As vias de acesso mais comuns à contaminação por EBOV são boca e olhos, pois o EBOV possui a habilidade de facilmente penetrar através das mucosas oral e conjuntiva. Adicionalmente, o contato sexual representa uma via com alto risco para a transmissão, dado o fato de que o vírus também se encontra no sêmen e outros fluidos sexuais (SCHNEIDER-FUTSCHIK et al., 2019; TRONCOSO, 2015).

Outro fator agravante para a transmissão e disseminação do EBOV que não pode deixar de ser abordado é a questão cultural. Tal fator foi abordado no documentário (*“Monkey Meat and the Ebola Outbreak in Liberia”*, 2014) exibido pelo canal *Vice News*, o qual exibiu o comércio de carne de animais silvestres, tais como macacos, veados e morcegos, cujo ocorre livremente, apesar dos alertas do governo Liberiano sobre uma possível contaminação e disseminação do EBOV. Ainda, os moradores da Monróvia, capital da Libéria, negam que haja a circulação do EBOV na cidade e acreditam que os alertas emitidos pelo governo tenham a função de angariar recursos de organizações internacionais. Ademais, considerando a baixa credibilidade do governo Liberiano, a evasão de pacientes dos hospitais e a resistência à internação dos doentes também contribuem para a disseminação e transmissão da doença. Além disso, muitos habitantes da

região acreditam que seus parentes terão seus órgãos roubados nos hospitais, então insistem em tratar seus familiares infectados em casa, assim, contribuindo para a não erradicação da doença.

2.4 Ciclo de Infecção do EBOV

Quando o EBOV invade o organismo, esse se replica em algumas células específicas do hospedeiro. Devido seu tropismo, o EBOV exibe uma afinidade maior por células dendríticas, monócitos, macrófagos, hepatócitos, células endoteliais, adrenocorticais e fibroblastos. A ligação desse às superfícies dessas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína (GP) tripolimérica presente na superfície do vírus, que interage com receptores específicos, TIM-1, em células epiteliais. Entretanto, em outros tecidos não há receptores específicos reportados (LENNEMANN, MAURY, et al., 2012; OLEJNIK, et al., 2011; LI, et al., 2015; SCHNEIDER, et al., 2019).

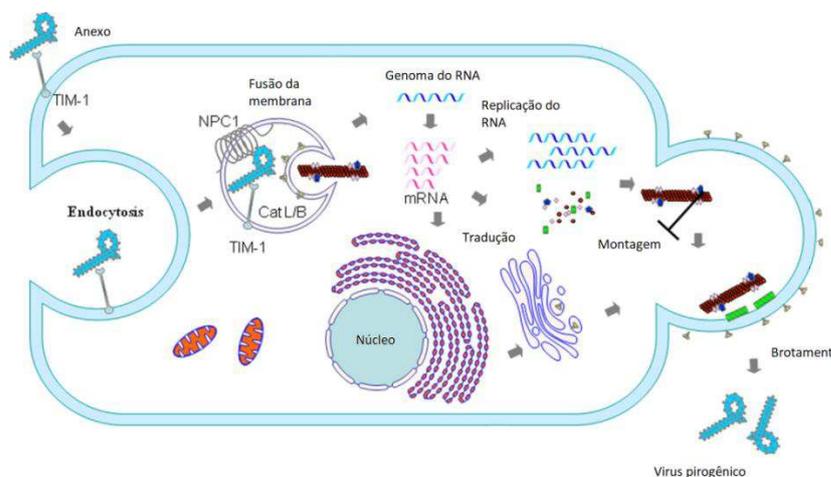
Segundo Rivera e Messaoudi (2016), dentre os tecidos supracitados, existem outros receptores envolvidos na infecção por EBOV. Nos hepatócitos existem as sialoglicoproteínas; lecitinas tipo C, como as não-integrinas e seus receptores específicos em células dendríticas, endoteliais e macrófagos; e lecitina humana específica para galactose/*N*-acetilgalactosamina em macrófagos (RIVERA; MESSAOUDI, 2016). A interação da glicoproteína viral (GP) com receptores de membrana gera uma sinalização que faz com que a célula hospedeira endocite a partícula viral por meio de endossomos, em um processo denominado macropinocitose (HUNT; LENNEMANN; MAURY, 2012; PENNY et al., 2019).

As catepsinas –L e –B dependentes do pH interno dos endossomos clivam as GPs presentes na superfície viral e expõem sítios de ligação (GP1 e GP2), que interagem com receptores do tipo *Niemann-Pick C1* (NPC1) na membrana endossomal. Pessoas que não apresentam receptores NPC1 funcionais tendem a apresentar uma maior resistência à infecção por EBOV (HUNT; LENNEMANN; MAURY, 2012). A subunidade GP2 interage através de um tipo de receptor diferente inserindo em uma proteína trimérica da membrana endossomal, que apresenta um mecanismo de fusão semelhante ao da subunidade GP1 (LI et al., 2015).

A fusão destas subunidades forma as estruturas HR1 e HR2, as quais compõem uma estrutura em seis hélices, que permite a passagem do RNA viral para o citoplasma. A replicação viral se inicia pela síntese completa de (+)ssRNA e (-)ssRNA pela proteína

estrutural L, onde, através da fita complementar, são sintetizados fragmentos de progênie genômicas completas. Estas poderão sintetizar novos fragmentos em novas replicações ou sintetizar partículas virais. Após a síntese completa, o (-)ssRNA é associado às partículas virais, seguido pelo brotamento da partícula viral através da membrana plasmática da célula hospedeira (HUNT; LENNEMANN; MAURY, 2012). O ciclo viral do EBOV está esquematizado na Figura 3.

Figura 3– Ciclo biológico do Ebola vírus.



Fonte: Li et al., 2015 (tradução e adaptação).

Como dito anteriormente, o RNA do EBOV codifica sete proteínas estruturais, NP, GP, VP24, VP30, VP35, VP40, e L; e duas glicoproteínas solúveis, GP1 e GP2 (ALMEIDA, 2015; MADELAIN et al., 2016). Dentre as proteínas virais do EBOV, a VP24 está associada ao envelope viral e possui afinidade pela membrana plasmática das células hospedeiras. Ainda, está envolvida no processo de evasão do sistema imune do hospedeiro, inibindo a sinalização por interferon (INF), bloqueando a subunidade alfa da importina (KNP- α) e, conseqüentemente, impedindo o acúmulo de tirosina-fosforilada STAT1 (PY-STAT, a principal molécula envolvida na resposta imune antiviral). Nesse mecanismo, a falta de acúmulo de STAT1 impede a expressão de genes na síntese induzida de INF- α , - β e - γ (GARCÍA-DORIVAL et al., 2014). A VP40 tem a função de manter a integridade estrutural das partículas virais. As proteínas NP, VP30, VP35 e L formam o núcleo capsídeo, associadas ao genoma viral. Apesar da NP estar associada ao complexo do capsídeo, também catalisa a transcrição do RNA viral. A VP35 age como um ativador transcricional (RIVERA; MESSAOUDI, 2016). As duas glicoproteínas solúveis, GP1 e GP2, existem como um trímérico na superfície viral. Estas são altamente glicosiladas e estão

envolvidas no mecanismo de fusão com a membrana endossomal. A subunidade GP1 é composta por três regiões, sendo sítio de ligação ao receptor (RBD); uma região altamente glicosilada; e o domínio tipo-mucina *O*-glicosilado. Por fim, a subunidade GP2 é mediadora do mecanismo de fusão com a membrana, semelhante à GP1 (HUNT; LENNEMANN; MAURY, 2012).

Estudos em macacos demonstram o grande tropismo do EBOV por monócitos, macrófagos e células dendríticas. Ainda, experimentos *in vitro* utilizando monócitos e macrófagos demonstram uma acentuada expressão de mediadores inflamatórios específicos, tais como IL-1B, IL-6, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 e TNF- α . Níveis elevados de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio também foram observados em plasma humano e modelos animais (RIVERA; MESSAOUDI, 2016).

Tendo em vista os mecanismos patogênicos do EBOV, notasse que a evasão viral do sistema imune é o fator principal, mediado pelas proteínas VP24 e VP35 (DAINO et al., 2018). Estas proteínas interferem nos mecanismos do sistema imune, facilitando a infecção das células de defesa. A contaminação dessas células leva à liberação de citocinas que aumentam a permeabilidade vascular, causando a síndrome hemorrágica do ebola. A sintomatologia da síndrome hemorrágica do ebola levou Geisbert e colaboradores (2003) a avaliar o efeito inibitório do fator de coagulação VIIa como um potencial tratamento, utilizando a proteína anticoagulante recombinante do nematódeo c2 (rNAPc2). Como resultado, o teste em macacos se mostrou promissor, uma vez que 33% dos macacos infectados e que apresentavam um quadro hemorrágico sobreviveram e, ainda, aqueles que vieram a óbito, resistiram por mais tempo (GEISBERT et al., 2003).

Flint e colaboradores (2019) identificaram a *N*-acetilglucosamina-1-fosfato transferase como um potencial alvo para o planejamento de inibidores do EBOV. Os pesquisadores identificaram por triagem, usando o CRISPR, um segmento genômico que codifica as subunidades alfa e beta da *N*-acetilglucosamina-1-fosfato transferase, envolvidas no processo de internalização do vírus. A linhagem celular GNPTAB-*knockout* demonstrou resistência à infecção por EBOV, uma vez que não codificam proteínas necessárias no processo de infecção (FLINT et al., 2019)

Devido à importância das proteínas estruturais e não estruturais reportadas em vários estudos, estas serão abordadas aqui, os principais compostos ativos (sintéticos e naturais) ativos frente a essas, bem como, compostos que não possuem um alvo específico.

O objetivo desse trabalho foi realizar um levantamento sobre os compostos estudados com potenciais tratamentos contra o EBOV, assim, compostos naturais,

sintéticos e estratégias imunológicas foram abordados. Dentre os trabalhos analisados, apesar daqueles voltados para o desenvolvimento de compostos inibidores de várias etapas do ciclo do EBOV e visando diferentes alvos estruturais, a estratégia mais comumente abordada volta-se para entrada do vírus na célula, entretanto a estratégia de tratamento mais promissora tem sido a imunológica. A seguir, todos os trabalhos serão discutidos em maiores detalhes.

2.5 Diagnóstico

Os métodos de referência em diagnóstico são microscopia eletrônica, cultura celular em células *Vero E6*, ensaio imunoenzimático ou inoculação em animais. Devido a razões técnicas e de biossegurança, essas técnicas foram dando lugar a outras, como o teste sorológico por técnica de ELISA.

Em função da emergência o preferencial é o uso do PCR. O PCR tem como alvo os genes que codificam as GP ou NP, o que permite trabalhar com amostras inativadas. Com a urgência frente ao surto, foram criados kits comerciais de PCR para uma abordagem mais efetiva frente ao surto. O PCR é um teste com alta especificidade e sensibilidade, e mesmo no formato de kits ainda apresenta dificuldades de implementação em campo dada a necessidade de ambientes separados, temperatura controlada, maquinário e mão de obra especializada.

Outra ferramenta utilizada é o teste de diagnóstico rápido (RDT), que detecta antígenos as proteínas VP40, GP e NP do EBOV. O primeiro a ser listado foi o ReBOV RDT, capaz de detectar as espécies *Zaire*, *Sudan* e *Bundibugyo ebolavirus* com 100% de sensibilidade e 92,2% de especificidade em relação ao PCR (MÉRENS; BIGAILLON; DELAUNE, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Compilar estudos científicos que apresentam alternativas para combater oEbola vírus, a partir da ótica da química medicinal.

3.2 Objetivos Específicos

- Compilar estudos sobre compostos de origem natural com atividade anti-Ebola;
- Compilar estudos sobre compostos de sintética com atividade anti-Ebola;
- Compilar informações sobre estratégias de tratamento envolvendo vacinas;
- Compilar estudos sobre compostos com atividade anti-Ebola, porém atuando por mecanismos desconhecidos;
- Compilar estratégias genéticas/imunológicas mais promissoras.

4 MÉTODOS

4.1 Revisão Bibliográfica

Para elaboração desta revisão bibliográfica foram realizadas pesquisas em bases de dados de textos de jornais e revistas, bem como, artigos e livros científicos, cujo tratassem do tema desse trabalho de conclusão de curso. Para tais buscas, apenas bases internacionais foram utilizadas, uma vez que a literatura nacional é escassa no assunto. Ainda, foram admitidos artigos de acesso aberto ou fechado. Por fim, a aplicação dos parâmetros descritos abaixo permitiu selecionar um total de 122 trabalhos para análise e elaboração do presente trabalho.

4.2 Palavras-chaves Utilizadas

Para a execução das buscas propriamente ditas, as seguintes palavras-chaves foram usadas: “*Inhibitors*”, “*Synthesis*”, “*Synthetic Compounds*”, “*Natural Compounds*”, “*Natural Products*”, “*Nature-Based*”, “*Nature*”, “*Literature Review*”, “*Epidemiology*”, “*Pathogenic Mechanism*”, “*Treatment*”, em combinação com as palavras “*Ebola*” ou “*EBOV*”, separadas pelo termo AND.

4.3 Ferramentas de Busca Utilizadas

Todas as buscas pelo material científico foram realizadas nas bases “*Science Direct*®”, “*Google Scholar*®”, “*Springer*®”, “*PubMed*®”, “*Nature*®” e “*Scifinder*®”, por meio de acesso via plataforma Periódicos CAPES (<https://www.periodicos.capes.gov.br/>) e utilizando as palavras-chaves citadas anteriormente. Ainda, websites contendo dados epidemiológicos também foram utilizados, tais como “*Ministério da Saúde - MS* (<https://saude.gov.br/>)”, “*World Health Organization - WHO* (<https://www.who.int/>)” e “*Centers for Disease Control and Prevention - CDC* (<https://www.cdc.gov/>)”. Além destes, os bancos de moléculas e proteínas “*DrugBank* (<https://www.drugbank.ca/>)” e “*RCSB Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>)” também foram acessados.

4.4 Critérios de Inclusão/Exclusão

No presente estudo foram apenas incluídos trabalhos revisados por pares, escritos em inglês, provenientes de periódicos indexados, sem restrição temporal. Dessa forma, artigos/textos publicados desde 1977 até 2020 foram analisados e utilizados para confeccionar esse TCC. Por fim, os trabalhos obtidos na literatura, após aplicação dos critérios supracitados, cujo não se enquadravam aos critérios de inclusão, foram completamente excluídos da análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Inibidores Específicos de Alvos do Ebola Vírus

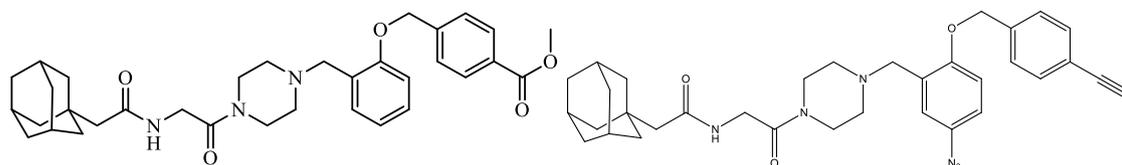
5.1.1 Inibidores de origem sintética

5.1.1.1 Inibidores do NPC1

Liu e colaboradores (2018) desenvolveram dois compostos dipeptídicos de piperazina adamantano capazes de impedir a ligação da GP viral com o receptor NPC1. Baseando-se em um dos compostos, 21 novos derivados diferentes foram sintetizados. Estes foram avaliados frente a células *Vero* infectadas com o vírus da estomatite vesicular (VSV) pseudotipado com a GP do EBOV. Assim, foi verificado que um dos compostos (Figura 4) foi capaz de diminuir a carga viral, com um valor de IC_{50} de 1,1nM.

Em análise a relação estrutura atividade, o produto da hidrólise do 4'-metil éster contendo o 4'-ácido carboxílico era menos ativo. A substituição do éster por amidas ou sulfonamidas diminuía o LogP, entretanto reduziam o potencial. O bioisómero oxazol é apenas ligeiramente mais efetivo, porém é facilmente degradado em microsossomos e a adição de grupamento amida aumenta a hidrólise. A substituição mais efetiva se dá na posição 5, quando adicionou-se cloro ou flúor a atividade antiviral aumentou em até 10 vezes. Por fim, os autores sugerem que este grupamento ocupa um pequeno espaço numa região hidrofílica do receptor NPC1 (LIU et al., 2018b).

Figura 4 – Dipeptídeo de piperazina adamantano ativo frente ao receptor NPC1 do EBOV.

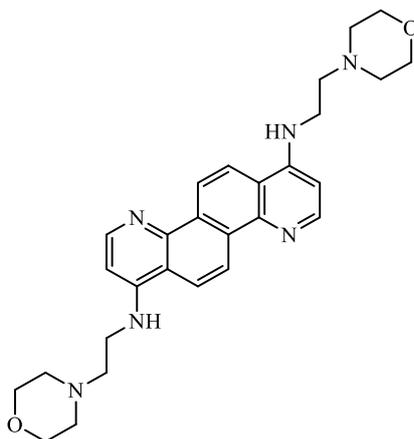


Fonte: Autor, 2020.

Selaković e colaboradores (2019) desenvolveram um estudo sobre a atividade da diazacriseno contra o EBOV. Ao todo, 23 compostos diferentes foram testados, onde um dos derivados (Figura 5) apresentou maior atividade inibitória, com um valor de EC_{50} de 0,21nM. Os testes foram feitos em células *HeLa* utilizando marcadores LC3. Os autores

propuseram que tal composto atua por inibição da ligação da GP ao NPC1, através da perturbação das funções lisossomais, bloqueando a entrada do vírus nas células do hospedeiro (SELAKOVIĆ et al., 2019).

Figura 5 – Estrutura química do derivado diazacriseno.

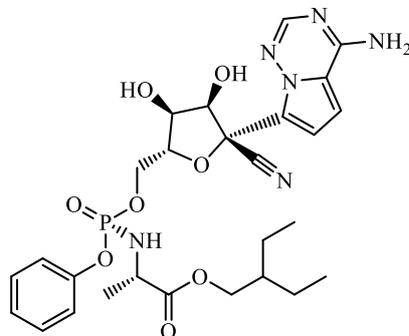


Fonte: Autor, 2020.

5.1.1.2 Inibidores da proteína L

Pesquisadores da *GileadSciences*[®]- US, do Instituto de pesquisa médica de doenças infecciosas do exército (USAMRIID), do Centro de Controle de Prevenção de Doenças (CDC) e da Universidade de Boston desenvolveram uma molécula denominada remdesivir (GS-5734)(Figura 6). Esta é um monofosforamidato, cujo é um pró-fármaco análogo à adenosina. Durante os ensaios enzimáticos foram utilizados RNA POLII, o recombinante humano POLRMT, fatores de transcrição A e B2 e complexos de ribonucleoproteína do vírus sincicial respiratório (RSV). O GS-5734 demonstrou atividade contra o vírus Marburg (MARV) e variantes do EBOV, ainda, em macrófagos e células endoteliais apresentou valores de IC₅₀ variando entre 0,06 e 0,14 nM. Foi verificado que o mecanismo de ação desta molécula dá através da inibição da proteína L (RNA-polimerase RNA-dependente) (WARREN et al., 2016).

Figura 6 – Estrutura química do remdesivir (GS-5734), um monofosforamidato inibidor da proteína L.

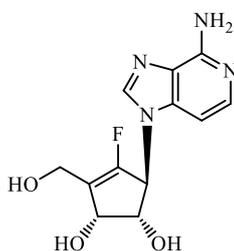


Fonte: Autor, 2020.

5.1.1.3 Inibidores da síntese de RNA viral

Liu e seus colaboradores (2018) desenvolveram um estudo com derivados do composto 6'-Fluoro-3-deazaneplanocina (Figura 7). O composto foi testado em linhagens de células *Vero* infectadas com EBOV. Foi verificado que este inibe a homocisteína hidrolase (SAHase), que atua na remoção do produto da *S*-adenosilhomocisteína (SAH). Esse mecanismo impede a metilação da *S*-adenosil metionina durante a formação do RNA, que afeta a síntese viral. Entre os compostos sintetizados, este composto foi capaz de reduzir a carga viral com uma EC_{50} de 0,36 nM (LIU et al., 2018a).

Figura 7 – Estrutura química do 6'-Fluoro-3-deazaneplanocina.



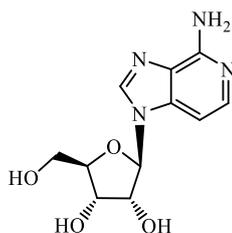
Fonte: Autor, 2020.

Bray e colaboradores (2000) observaram que o análogo de adenosina 3-deazaneplanocina (Figura 8), quando administrado durante nove dias de 2,2 a 20 mg/Kg em um ser humano adulto e imunocompetente, evita a forma letal da viremia. Então, reportaram semelhante e/ou maior efeito utilizando uma única dose de 80 mg/Kg desse mesmo análogo ou 1 mg/Kg do análogo 3-deazaneplanocina. Acredita-se que o composto

exerça sua atividade antiviral levando a um processo de redução da porção 5' do RNAm viral, inibindo a atividade enzimática do hospedeiro.

Os análogos agem de forma inibitória contra a enzima SAHase do vírus, impedindo a replicação viral. Os testes foram conduzidos em células *Vero E6* clonadas de rim de macaco e de ratos infectados com o EBOV. Os ratos tratados com adenosina 3-deazaneplanocina apresentaram maior índices de sobrevivência até o 8º dia, com doses a partir de 20mg/Kg. Valores menores que 20 mg/Kg conduzem a índice zero de sobrevivência. Os ratos tratados com 3-deazaneplanocina demonstraram altos índices de sobrevivência até o 7º dia, com doses a partir de 0,25mg/Kg. Abaixo dessa dose o índice foi insatisfatório. Os ratos do grupo placebo tratados com ambos os análogos tiveram índice de sobrevivência zero (BRAY; DRISCOLL; HUGGINS, 2000).

Figura 8 – Estrutura química do 3-deazaneplanocina A.



Fonte: Autor, 2020.

Em 2002, novamente Bray e colaboradores constataram que o análogo de adenosina 3-deazaneplanocina possui, além da ação inibitória da síntese de DNA e RNA viral, efeito protetor devido ao aumento da produção de INF- α , cujo é reduzida pelos mecanismos infecciosos do EBOV. Esse experimento foi conduzido em ratos infectados com EBOV, seguido por ensaios citoquímicos (BRAY et al., 2002).

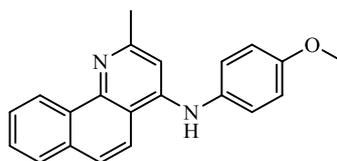
Warfield e colaboradores (2006) desenvolveram uma estratégia de combate à infecção por EBOV utilizando um oligômero fosforamidato de morfolina de sentido reverso (PMOs). Uma sequência de PMOs é capaz de se ligar ao mRNA viral, inibindo a formação de proteínas VPs e L. PMOs específicos para EBOV, testados em células *Vero E6*, com concentração acima de 20 μ M, foram capazes de reduzir a carga viral sem apresentarem toxicidade evidente. Em roedores, os PMOs específicos foram capazes de prevenir a infecção fatal por EBOV. Em macacos *Rhesus*, nenhum PMOs VP35 preveniu a infecção fatal por EBOV, enquanto PMOs VP24, 35 e proteína L demonstraram atividade. A estrutura do PMO é dada pela sequência homologa ao VP35 (5 9-

CCTGCCCTTTGTTCTAGTTG-39), VP24 (5'-GCCATGGTTTTTCTCAGG-3') e a proteína L (5'-TGGGTATGT)(WARFIELD et al., 2006).

Através de ensaios minigenômicos do EBOV, Luthra e colaboradores (2017) rastrearam atividade anti-EBOV dentre uma gama de moléculas, onde identificaram potencial atividade em derivados de benzoquinolina.

A análise entre estrutura e atividade inicialmente verificou que os anéis fenil internos e terminais eram importantes para manter a atividade. A ligação N-H pode ser acilada ou metilada, mas não poderia ser substituído H por O. A atividade do composto se manteve frente a várias substituições do anel anilina. Substituições na posição 2 do anel comprometem a atividade. Entretanto, a adição de grupos retiradores de elétrons na posição 3 ou doadores de elétrons na posição 4 aumentam a atividade do composto, o que levou a identificação do SW456 (Figura 9) que apresentou maior potencial inibitório (LUTHRA et al., 2017).

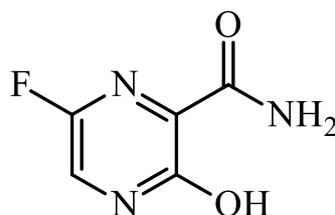
Figura 9 – Estrutura química do composto SW456.



FONTE: Autor, 2020.

Em 2017, Zhang e colaboradores avaliaram o potencial terapêutico do favipiravir (Figura 10) frente ao EBOV. O composto é capaz de inibir a replicação do RNA viral através da inibição direta da enzima RNA-dependente RNA polimerase, porém, sem mecanismos esclarecidos. Foram aplicados ensaios de citotoxicidade e eficácia em cultura de células *Vero C1008*, o resultado obtido foi uma inibição viral de IC₅₀ igual a 67 μM.

Figura 10 – Estrutura química do favipiravir.



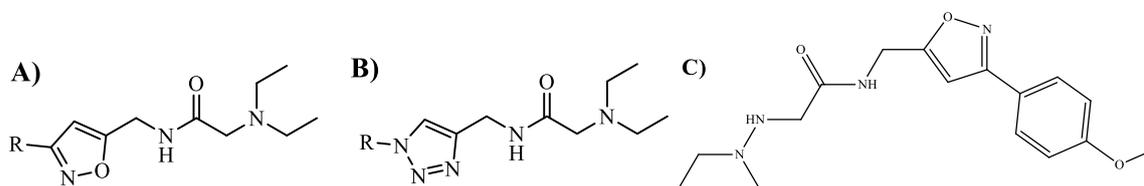
FONTE: Autor, 2020.

5.1.1.4 Inibidores da proteína GP

Yermolina e colaboradores (2011) desenvolveram um grupo de moléculas capazes de inibir a proteína GP dos vírus EBOV e MARV, utilizando a técnica de pseudotipagem com partículas de HIV para a proteína GP do EBOV.

Para análise da REA, foram analisados 56 derivados isoxazóis (Figura 11A) e triazóis (Figura 11B). Com isso os pesquisadores verificaram que, enquanto o anel isoxazol pode ser substituído por um triazol, o substituinte 5-(dietilamino) acetamida é necessário para inibição viral. A variação do substituinte 3-aryl também levou a uma série de antivirais potentes. Adicionalmente, o derivado 5-(dietilamino) acetoamida (Figura 11C) foi identificado como um inibidor seletivo para entrada do EBOV, com um valor de IC_{50} de 30 nM. Além do seu potencial uso terapêutico, este análogo também pode ser utilizado para fins de estudo de mecanismo de entrada mediado pela proteína GP de filovírus (YERMOLINA et al., 2011).

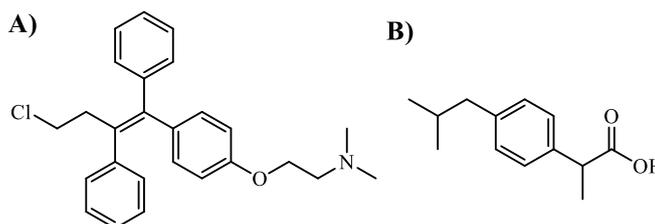
Figuras 11 – Estruturas químicas dos compostos isoxazol C-5 substituído (A); 1,2,3-Triazol C-1 substituído (B) e 5-(dietilamino)acetoamida (C).



Fonte: Autor, 2020.

Zhao e colaboradores (2016) estudaram a ação do toremifeno (Figura 12A), um medicamento utilizado contra o câncer e o ibuprofeno, um anti-inflamatório (Figura 12B), frente ao EBOV. Essas moléculas se ligam à GP entre as subunidades GP1 e GP2 e desestabilizam a fusão da GP e da membrana endossomal. Tal fato foi observado através de cristalografia de raio-X (obtida com uma resolução de 2,2 Å), onde verificou-se a capacidade do toremifeno em desestabilizar a estrutura de hélices nas subunidades α , mostrando-se como um promissor candidato para futuros testes como inibidor da fusão e entrada do EBOV (ZHAO et al., 2016).

Figura 12 – Estrutura química do composto toremifeno (A) e ibuprofeno (B).

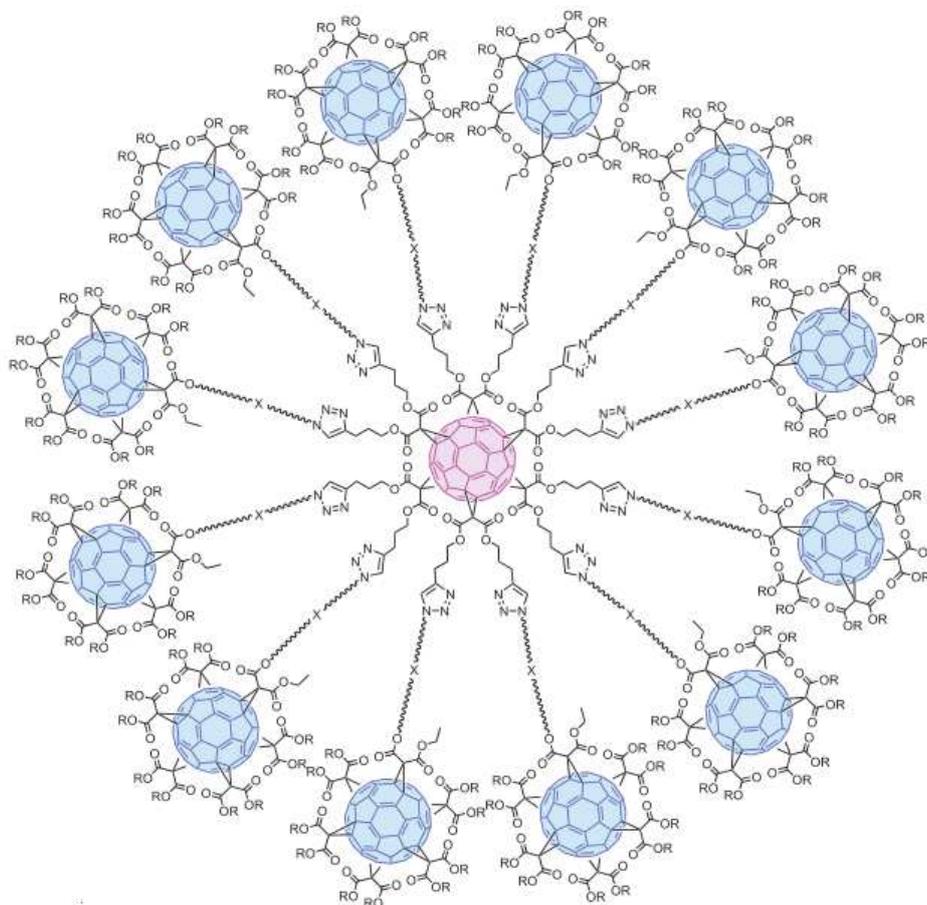


Fonte: Autor, 2020.

Em 2014, Garrison e colaboradores avaliaram o potencial inibitório da citovirina cianobacteriana (SVN). A citovirina é uma proteína antiviral isolada da cianobacteria *Scytonema varium* que se liga à proteína GP do EBOV e impede a entrada do vírus na célula. Foi verificado que 30mg/Kg/dia, administrados a cada 6 horas, se mostrou capaz de diminuir a mortalidade em até 90%. Ainda, foi observado que a carga viral também foi reduzida, após dois dias de tratamento. Para a realização destes testes, o SVN foi isolado da *E. colie* ensaios *in vitro* foram realizados com células *Vero E6* para verificar a inibição do vírus e ensaios de ELISA, para verificação da ligação entre a SVN e a proteína GP do EBOV. Nos ensaios com células *Vero E6* infectadas, a SVN foi capaz de inibir EBOV com um valor de EC_{50} de 41 nM. O ensaio de ATPase foi incapaz de avaliar citotoxicidade para uma concentração de $SVN \geq 10,3$ nM. O teste de Western Blot demonstrou que o domínio muscina é uma região importante para determinação da atividade antiviral da proteína SVN (GARRISON et al., 2014).

Em 2016, Muñoz e colaboradores desenvolveram estruturas cujo nomearam genericamente de “superbolas”. Essas estruturas são adutos de *hexakis* de 60 fulerenos, contendo 120 unidades de carboidratos periféricos (Figura 13). Tais enormes estruturas são sintetizadas por uma cicloadição de azida-alcino catalisada por cobre. Essas estruturas impedem a entrada do vírus, mimetizando sistemas biológicos. Os testes foram conduzidos utilizando partículas lentivirais pseudotipadas com EBOV-GP, onde no total 3 substituintes foram testados. O composto do estudo demonstrou alta eficácia na inibição do EBOV, exibindo um valor de IC_{50} de 667 pM (MUÑOZ et al., 2016).

Figura 13 – Estrutura química do aduto de *hexakis* de 60 fulerenos contendo 120 unidades de carboidratos periféricos.



FONTE: (MUÑOZ et al., 2016).

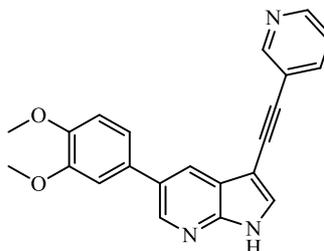
5.1.1.5 Inibidores da AP2 associada à proteína quinase 1 (AAK1)

Verdonck e colaboradores (2019) desenvolveram o composto 3,5-dissubstituído-pirrol[2,3-*b*]piridina (Figura 14), ativo contra o vírus dengue (DENV) e EBOV. Esse composto inibe a AP2 associada à proteína quinase 1 (AAK1), diminuindo o tráfego intracelular de vários RNA's virais não relacionados. Como resultado, obteve-se que tal composto inibe a AAK1 com um valor de IC_{50} de 40 nM. Adicionalmente, este apresentou valores de EC_{50} e CC_{50} de 1,59 e 10 μ M frente ao EBOV e em ensaios de citotoxicidade, respectivamente.

As análises entre estrutura e atividade foram focadas na porção 7-aza-indol. A metilação do nitrogênio pirrólico diminuiu bastante a afinidade com a enzima AAK1 e consequentemente a atividade antiviral, bem como a inserção de um nitrogênio a mais na metade porção pirrol que diminuiu drasticamente sua atividade. Quando a porção piridina

foi substituída pela porção pirazina, foi observada uma maior afinidade com a enzima, entretanto sua citotoxicidade também aumentou. Por fim, a ligação entre o composto e a AAK1 foi confirmada por cristalografia de raio-X (VERDONCK et al., 2019).

Figura 14 – Estrutura química do composto 3,5-dissubstituído-pirrol[2,3-*b*]piridina.



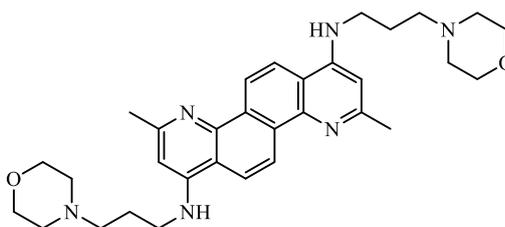
Fonte: Autor, 2020.

5.1.1.6 Inibidores do brotamento e montagem viral

Opsenica e colaboradores (2011) sintetizaram uma série de compostos derivados do 1,7-*bis*(aminoalquil)diazacrisceno (1,7-DAAC) (Figura 15) capazes de inibir a atividade de três diferentes patógenos: toxina botulínica sorotipo A de cadeia leve, *Plasmodium falciparum* e EBOV. Apesar da sua atividade frente ao EBOV, os compostos também apresentaram atividade contra uma gama de outros vírus, tais como DENV, hepatite C (HCV) e HIV-1. Os autores sugerem que as atividades inibitórias destes compostos estejam relacionadas com a capacidade de inibir a montagem e o brotamento do vírus. Os ensaios relacionados à atividade frente ao EBOV foram conduzidos utilizando células *Vero76*. A maioria dos derivados apresentou toxicidade à concentração 20 μ M.

Os pesquisadores, em relação ao estudo estrutura-atividade concluíram que as ligações propilamino, bem como, as ligações butilamino proporcionam maior atividade inibitória que seus derivados relacionados. Substituição no nitrogênio da cadeia lateral terminal demonstra certa inconsistência, segundo o autor isso indica limitações estereoquímicas em substituições da cadeia lateral amino. Incorporações no anel morfolino causam maior impacto negativo na atividade (OPSENICA et al., 2011).

Figura 15 - Estrutura química do 1,7-DAAC.

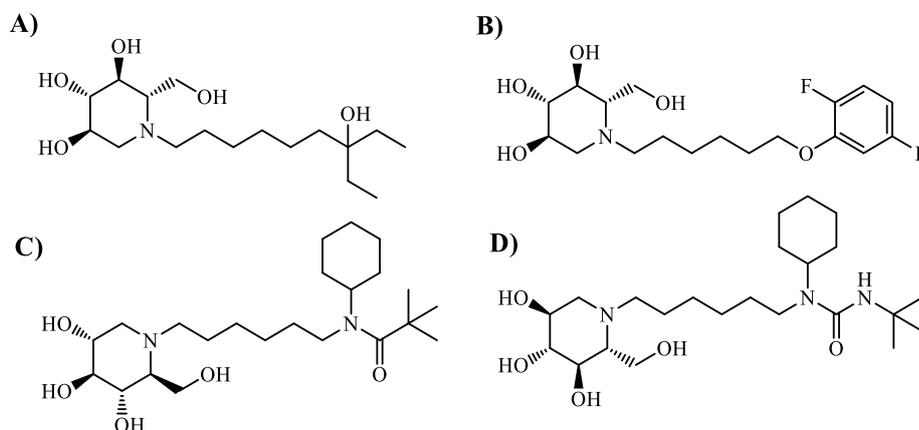


Fonte: Autor, 2020.

5.1.1.7 Inibidores da α -glicosidase do retículo endoplasmático

Chang e colaboradores (2013) reportaram alguns estudos tratando do potencial antiviral da molécula CM-10-18 (Figura 19) e seus derivados contra vírus que causam febre hemorrágica. Os derivados demonstraram atividade *in vitro*, além de reduzirem a taxa de mortalidade em ratos devido à infecção por MARV e EBOV. Tal derivado possui efeito inibitório sobre as enzimas α -glicosidases-1 e 2 do retículo endoplasmático, levando ao “desdobramento” e degradação dessas glicoproteínas, assim, diminuindo a secreção de vírions. Os derivados do CM-10-18 (B-D) (Figura 16) foram sintetizados e isolados com pureza de 95%, as modificações da estrutura molecular foram aplicadas à cadeia lateral alquila. Os derivados obtidos foram selecionados a partir de um estudo de REA envolvendo 120 moléculas. As enzimas foram isoladas de fígado de rato e utilizadas para avaliar o potencial inibitório da molécula sobre as α -glicosidases-1 e 2. Os testes de eficácia contra MARV e EBOV foram conduzidos em ratas do tipo BALB/c, onde os que sobreviveram até o 14º dia foram considerados protegidos. Os ensaios antivirais demonstraram que o CM-10-18 (A) apresenta um valor de EC_{50} de 0,54 μ M frente ao EBOV, e seus derivados (B, C, D), variam entre 0,9 e 0,48 μ M (CHANG et al., 2013).

Figura 16 - Estruturas químicas dos compostos CM-10-18 (A) e seus derivados, IHVR11029 (B), IHVR17028 (C) e IHVRV19029 (D).

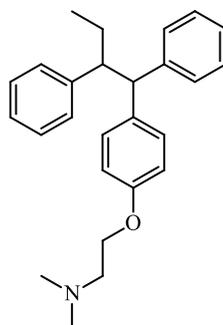


Fonte: Autor, 2020.

5.1.1.8 Moduladores seletivos de receptores de estrogênio

Em 2017, Fan e colaboradores realizaram um estudo onde avaliavam a atividade anti-EBOV do tamoxifeno (Figura 17) e clomifeno, moduladores seletivos de receptores de estrogênio. Os testes foram conduzidos em ensaios com pseudovirions de EBOV e EBOV VLP-mcherry, este último composto pelas proteínas GP, VP-40 e VP-40mcherry. Os pesquisadores concluíram que apesar do efeito inibitório dos moduladores seletivos de receptores de estrogênio, o mesmo não ocorria pelo caminho dos receptores de estrogênio. Os moduladores levam ao aumento do acúmulo de colesterol impedindo a entrada do vírus, o que classificaram como atividade biológica incidental (FAN et al., 2017).

Figura 17—Exemplo de modulador seletivo de receptores de estrogênio, Tamoxifeno.

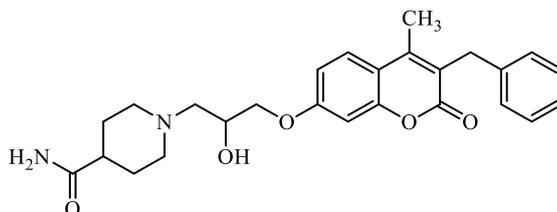


Fonte: Autor, 2020.

5.1.1.9 Reposicionamento de Anti-histamínicos

Em estudos anteriores, Cheng e colaboradores (2017) identificaram o potencial anti-EBOV dos anti-histamínicos, capazes de bloquear a entrada do vírus na célula. Com base nessa evidência, os pesquisadores rastrearam a atividade anti-EBOV de 1.220 compostos conhecidos com atividade anti-histamínica. As moléculas foram triadas através do método baseado em ligantes e testadas em células epiteliais basais alveolares humanas adenocarcinômicas. Dentre as moléculas testadas, a estrutura de anel fundido de cumarina, composto cp19 (Figura 18), demonstrou maior atividade anti-EBOV com IC_{50} de 1,2 μ M, devido ao substituinte hidrofóbico na posição 3 e/ou 4 para melhor interação com o alvo (CHENG et al., 2017).

Figura 18 - Estrutura química do composto cp19.



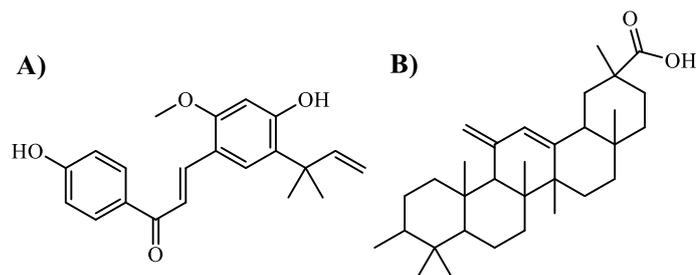
Fonte: Autor, 2020.

5.2 Inibidores de Origem Natural

5.2.1. Inibidores da nucleoproteína (NP)

Fu e colaboradores (2016) identificaram dois compostos no extrato de raiz de alcaçuz, a licochalcona (A) e o ácido 18- β -glicirrhetínico(B) (Figura 19), que seriam capazes de interagir com a nucleoproteína (NP) do EBOV e MARV. Foi utilizada espectrometria de massas acoplada ao UV-vis para determinação da interação com a proteína viral e análise por espectrometria de massas para análise dos mesmos. Através do software XCMS[®] foram analisados os dados obtidos para avaliação da interação com a NP. Docking *in silico* foi aplicado para análise da interação com NP. Dentre os compostos naturais analisados, a licochalcona (A) e o ácido 18- β -glicirrhetínico (B) foram os que apresentaram interação com a proteína NP. A NP é importante na replicação e transcrição do RNA viral, dada associação da estrutura da NP ao genoma (FU et al., 2016).

Figura 19 – Estrutura química da licochalcona (A) e do ácido 18- β -glicirrhetínico (B).

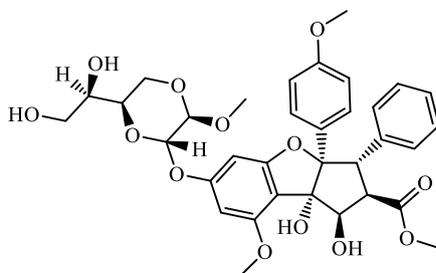


FONTE: Autor, 2020.

5.2.2. Inibidores da RNA-helicaseFA4

Biedenkopf e colaboradores (2017) identificaram na *Aglaia flaveolata* um composto denominado silvestrol (Figura 20). Dessa forma, os autores decidiram avaliar o potencial anti-EBOV deste. Os experimentos foram realizados em células *Huh7* (hepatoma humano) e células *VeroE6*. Verificou-se que o silvestrol possui potente ação inibitória sobre a replicação do EBOV, inibindo a RNA-helicase FA4. Ainda, foi verificado que este composto tem efeito sobre a proliferação do EBOV em células *Huh-7* (BIEDENKOPF et al., 2017).

Figura 20 – Estrutura química do silvestrol.

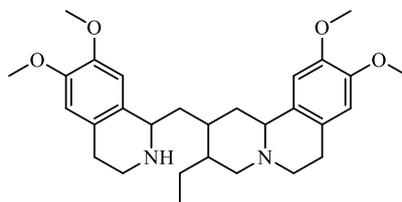


FONTE: Autor, 2020.

Yang e colaboradores (2018) realizaram uma triagem utilizando anticorpos anti-ZIKV da proteína não-estrutural 1 (NS1). Dessa forma, identificaram que o alcaloide emetina (Figura 21), um composto aprovado pela FDA para tratamento de amebíase, apresenta atividade inibitória contra diversos vírus. Nos testes conduzidos para avaliar a atividade da emetina frente ao EBOV, este demonstrou ser capaz de inibir a entrada do vírus através da atividade sobre a NPC1, mecanismo associado à entrada do EBOV nas células alvo. No ZIKV, o composto foi capaz de agir em vários alvos diferentes,

conferindo maior atividade à molécula, além de agir também com proteínas das células do hospedeiro, reduzindo o índice de seletividade (YANG et al., 2018).

Figura 21 – Estrutura química da Emetina.



FONTE: Autor, 2020.

Zhang e colaboradores (2016) utilizaram o extrato de *Prunella vulgaris* (CHPV) para investigar seu potencial antiviral contra o EBOV. Nesse sentido, os pesquisadores utilizaram pseudotipos de partículas do EBOV expressando a proteína GP (EBOV-GP-V) para verificar o potencial inibitório da entrada viral, mediada pela proteína GP. Os testes foram conduzidos em culturas de células *HeLa*, *VeroE6*, *HEK293T* e *A549*. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram nenhum efeito tóxico significativo. Avaliando a sinergia entre o Mab 2G4 (anticorpo monoclonal) e o CHPV, verificou-se que isoladamente a inibição viral pode chegar até ~50%, entretanto, quando administrados juntos, a inibição do EBOV pode alcançar uma taxa de 81% (ZHANG et al., 2016).

Barrientos e colaboradores (2003) testaram a cianovirina-N (CV-N) (Figura 22) como inibidor da entrada do EBOV, baseando-se na capacidade já conhecida de inibir as glicoproteínas do HIV e destas serem semelhantes às proteínas do EBOV. Os testes *in vitro* e *in vivo* confirmaram que a CV-N possui atividade frente ao EBOV, além de evitar efeitos citopáticos. O CV-N do estudo foi obtido através de métodos recombinantes e a análise foi obtida através de método Western Blot CV-N/GP1, 2. O EBOV dos subtipos *Sudan*, *Zaire*, *Ivory* e *Reston* foram multiplicados em células *VeroE6*. A atividade antiviral *in vitro* se mostrou inefetiva abaixo de 0,04 μM . No entanto, com um EC_{50} de 0,12 μM não se observou aumento significativo na resposta biológica, porém observou-se efeitos tóxicos em células infectadas e não infectadas. Em ratos, o tratamento não pôde prevenir a morte dos espécimes, mas diminuiu os sintomas da infecção (BARRIENTOS et al., 2003).

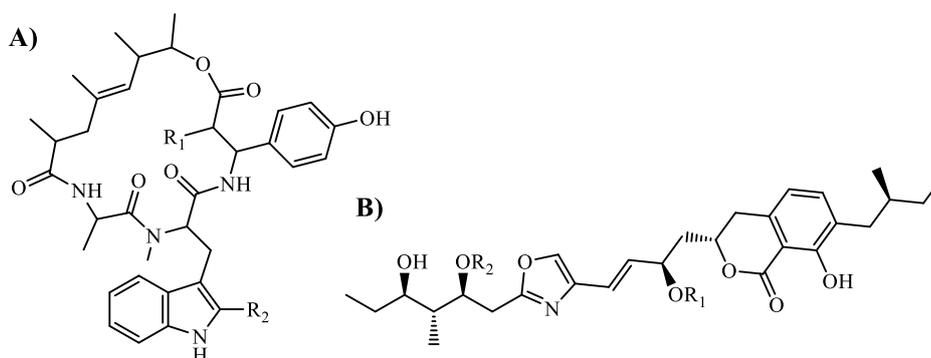
Figura 22- Estrutura tridimensional da Cianovirina-N (CV-N) em complexo com dímeros de manose.



Fonte: Autor, 2020. (PDB: 2RDK).

Beck e colaboradores (2016) avaliaram a atividade de metabólitos secundários de mixobactérias frente à infecção por EBOV. Os metabólitos secundários em questão foram as chondramidas (Figura 23A) e noricumazol A (Figura 23B).

Figura 23 – Estrutura química do composto chondramida (A) e noricumazol (B).



Fonte: Autor, 2020.

Ainda, esses metabólitos secundários têm efeitos antivirais, antibacterianos e antifúngicos. Já no EBOV, estes agem inibindo a entrada do vírus na célula, mediada por GP. Os testes foram conduzidos em partículas virais pseudotipadas com GP e a contraprova foi realizada em VSV-G. As células de cultura utilizadas para o vírus foram células *HeLa* e *HEK 293T*. Os testes demonstraram valores de IC_{50} de $0,33 \mu M$ em EBOV e $0,75 \mu M$ em VSV-G para o noricumazol A. Este é um inibidor de canal de potássio TPC2, sendo o mais promissor composto na prevenção da infecção por EBOV (BECK et al., 2016).

5.3 Desenvolvimento de Vacinas

O campo da imunologia tem avançado bastante no que diz respeito ao tratamento do EBOV. Segundo a OMS num artigo de 23 de Setembro de 2019 (Geneva), atualmente existe uma vacina distribuída pela Merck[®], a chamada rVSV-ZEBOV-GP. Esta tem sido distribuída para mais de 200mil pessoas. Além disso, a República Democrática do Congo apresentou planos de introduzir uma nova vacina desenvolvida pela *Jhonson&Jhonson*[®] em áreas que não tem transmissão ativa do EBOV. A rVSV-ZEBOV demonstrou em resultados preliminares, resultados de 100% de eficácia, de acordo com a OMS (2016). A fase de testes foi aplicada sobre os casos confirmados de EBOV em laboratório, todos que tiveram contato foram rastreados e randomizados para os testes com a vacina (HENAO-RESTREPO et al., 2015).

A vacina rVSV-Marburg pode prevenir a doença mesmo quando administrada 30 minutos após inoculação, o que significa que tem potencial efeito profilático pós-exposição. A rVSV-Ebola demonstrou ser capaz de reduzir a mortalidade pela metade, quando administrada 30 minutos após a inoculação do vírus em animais. Essas vacinas são efetivas quando administrada via oral ou nasal. Apesar dos avanços na prevenção e tratamento do EBOV, Bausch e colaboradores (2008) demonstraram certa preocupação quanto à condução dos testes, de acordo com uma perspectiva ética (BAUSCH et al., 2008).

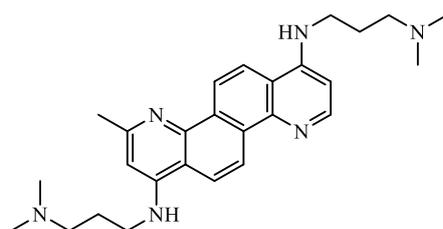
Em 2018, dado o surto de EBOV no Congo, o governo aprovou cinco alternativas para o tratamento dos infectados. O Zmapp, oferecido pela *MappBiopharmaceutical's* é baseado em uma combinação de três drogas mAbs (anticorpos monoclonais) diferentes, agindo sobre a proteína GP do vírus impedindo a entrada na célula. REGN-EB3 pela *Regeneron's* também se baseia em mAbs com a GP como alvo. Essa combinação oferecida pela *Regeneron's* passou pela fase 1 de testese com bons resultados, ao contrário da oferecida pela *MappBiopharmaceutical*, que ainda não tem eficácia comprovada.

5.4 Inibidores Sem Alvos Específicos

Aman e colaboradores (2009) identificaram uma molécula a qual denominaram FGI-106 (Figura 24), capaz de inibir a febre hemorrágica letal causada por patógenos, tais como EBOV, VRF e DENV. Além desses, outros testes indicam potencial efeito inibitório contra ou vírus da HCV e do HIV. Tais testes foram conduzidos em células *Vero E6*,

células do hepatoma humano para HCV, células *MT-4* para HIV e testes em ratos para verificar a eficácia desta molécula. O EC_{90} determinado foi de $0,6 \mu\text{M}$ e toxicidade observada na concentração de $10 \mu\text{M}$ em células *Vero E6*. Em ratos, o uso profilático demonstrou valores de EC_{50} de 100 nM e EC_{90} de $0,5 \mu\text{M}$, no tratamento de ratos infectados pelo EBOV (AMAN et al., 2009).

Figura 24 – Estrutura química do composto FGI-106.

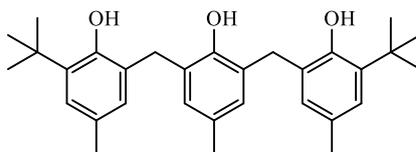


FONTE: Autor, 2020.

A pesquisa por moléculas com atividade inibitória do EBOV levou à identificação da molécula NSC 62914 (Figura 25) por Panchal e colaboradores (2012). Além de sua atividade inibitória frente ao EBOV, também foi identificada atividade frente ao vírus da febre de Vale Rift (VRF), Lassa mammarenavirus (LASV) e vírus da encefalite equina venezuelana (VEV). Os autores propuseram que essa molécula atua por um mecanismo relacionado à sua atividade antioxidante. O metabolismo do oxigênio do organismo produz espécies reativas de oxigênio que funcionam, em baixas concentrações, como sinalizadores para atividade antimicrobiana e antitumoral. No entanto, quando há quantidades elevadas de espécies reativas de oxigênio, pode ocorrer dano a nível celular.

O NSC 62914 induz à expressão do gene antioxidante Nrf2-regulado. Para o uso de antioxidantes no tratamento do paciente é necessário acompanhar o estresse oxidativo por biomarcadores. Esta pesquisa foi conduzida em células *Vero76* infectadas com os vírus VRF, LASV, EBOV e MARV. Os ensaios antioxidantes foram conduzidos em kits ABTS⁺. Foi aplicado PCR quantitativo em tempo real durante os ensaios de inibição viral. Os ensaios antivirais demonstraram uma taxa de 80% de sobrevivência no tratamento com 2 mg/Kg/injeção e 50% no tratamento pós-infecção, utilizando o mesmo esquema terapêutico. O aumento da dosagem para 5 mg/Kg/injeção não aumentou a taxa de sobrevivência das células infectadas, entretanto, observou-se um aumento na taxa de efeitos citotóxicos (PANCHAL et al., 2012).

Figura 25 - Estrutura química do composto NSC 62914.

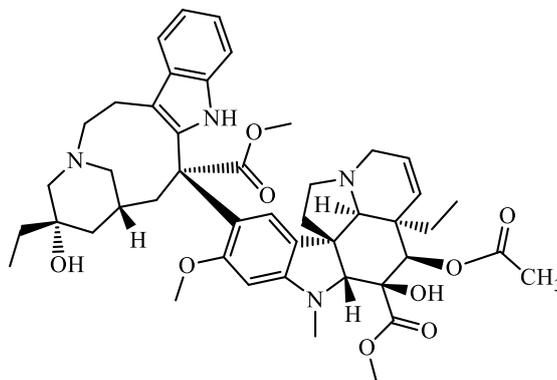


Fonte: Autor, 2020.

Em 2014, Tawa e colaboradores fizeram um estudo onde verificaram a atividade de uma série de compostos frente ao EBOV. Os compostos utilizados foram selecionados dentre os previamente aprovados para uso pela FDA. Todos os testes foram conduzidos em laboratório de biossegurança nível 2, em função dos testes terem sido feitos em partículas do tipo EBOV, contendo proteína GP e VP40 fundida à β -lactamase. O estudo teve por objetivo fazer uma triagem entre moléculas já aprovadas para futuros estudos em nível 4 de biossegurança, com outras partículas virais. As classes dos compostos selecionados são diversas, dentre elas inibidores de microtúbulos, modulador de estrogênio, anti-histamínicos, antipsicóticos, inibidores de bomba, antibióticos e anticâncer.

A cultura de células foi feita com células *HeLa*. Inicialmente, foram verificados 600 compostos aprovados pelo FDA, utilizando como critérios, $IC_{50} < 10 \mu M$ e inibição máxima de $> 70\%$ em ensaios com partículas do tipo EBOV. Dessa forma, foram selecionados apenas 29 fármacos. Após a avaliação de citotoxicidade, restaram apenas 23 fármacos. Dentre essas moléculas, a mais promissora foi a vimblastina (Figura 26), um inibidor da formação de microtúbulos, apresentando um valor de IC_{50} de 48 nM. Por fim, os autores sugeriram que mais testes utilizando a forma “selvagem” do EBOV podem fornecer maiores conclusões (TAWA et al., 2014).

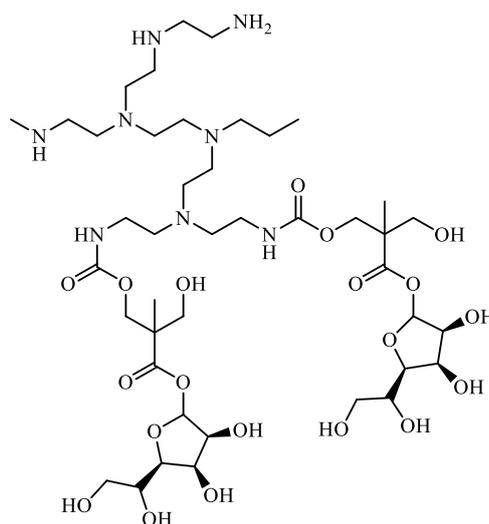
Figura 26 – Estrutura química do composto Vimblastina.



FONTE: Autor, 2020.

Em 2016, Ichiyama e colaboradores propuseram uma forma de tratamento antiviral utilizando macromoléculas multifuncionais. Essas moléculas têm por objetivo competir com o EBOV pelo receptor TIM, assim como neutralizar o pH endossomal para diminuir a replicação viral. O estudo foi conduzido em alguns vírus, incluindo o EBOV, que mostrou um IC_{50} de 4,7 mg/L e um índice de seletividade maior que 213 (CC_{50}/EC_{50}). A molécula em questão é uma polietilenimina polímero de manose (Figura 27), sintetizada pelos pesquisadores que conduziram o estudo e elucidada por RMN de 1H e ^{13}C . Os testes foram realizados em linhagens celulares *LLC-MK2*, *A549*, *Vero*, *MDCK*, e *RD*, além de células mononucleares obtidas de humanos doadores (ICHIYAMA et al., 2016).

Figura 27 – Estrutura química da polietilenimina polímero de manose.



FONTE: Autor, 2020.

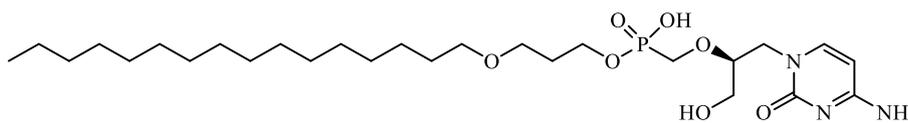
Hodge e colaboradores (2016) avaliaram a atividade da ranpirnase frente à infecção por EBOV, trata-se de uma endorribonuclease isolada de oocitos que até então já estava em testes clínicos de fase III para tratamento do mesotelioma e outros tipos de cânceres malignos. Durante os testes clínicos, a endorribonuclease em questão apresentou poucos eventos adversos sérios e baixa toxicidade. A ranpirnase age degradando RNA's e possivelmente atua na superfície celular. Estudos estruturais verificaram uma estabilidade estrutural alta, tornando-a resistente a proteólise.

Foram conduzidos testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial da ranpirnase frente ao EBOV, visto que essa já apresenta atividade antiviral em trabalhos mais recentes, contra HIV-1. Foram utilizadas células *Vero* e *Vero E6* para os testes *in vitro*. Para os

ensaios *in vivo* foram utilizadas partículas virais adaptadas ao rato para testes e o tipo de rato utilizado foi o C57BL/6 para estudo profilático e BALB/c para estudo pós-exposição. Por fim, verificou-se que a ranpirnase inibe o EBOV com EC₅₀ de 0,5-0,73 µg/mL nas multiplicidades de infecção 0,75 e 0,5 MOI, ainda é capaz de ser usada como uma medida profilática (HODGE et al., 2016).

Olinger e colaboradores (2016) verificaram a atividade do brincidofovir (Figura 28) frente à infecção por EBOV. Nos testes foram utilizadas as linhagens celulares *A549*, *HT-1080* e *VeroE6* para obtenção de proteínas recombinantes NP e VP35 do vírus e células *Huh-7* para testes com o brincidofovir. Os valores de EC₅₀ para o brincidofovir em diferentes linhagens celulares variam de 0,22 a 0,57 µM, com exceção da linhagem *Vero E6*, com 8,05 µM (OLINGER et al., 2016).

Figura 28 – Estrutura química do brincidofovir.



FONTE:Autor, 2020.

5.5 Estratégia Genética

Jain e Baranwal, em 2019, utilizaram algoritmos e docking molecular com a finalidade de produzir vacinas atenuadas ou inativadas de forma mais segura, relativamente mais fácil e sem a necessidade de cultura de organismos patogênicos. Foram analisadas proteínas com epítomos imunogênicos, capazes de interagir com moléculas HLA (*human leukocyte antigen*) na busca de candidatos a vacina. A partir 1.092 sequências de peptídeos analisadas e triadas, 22 sGP e a partir delas, 6 sequências foram selecionadas. Dessas, 4 peptídeos demonstraram capacidade em interagir com 18 alelos diferentes, entre eles HLA-A, B, DP, DQ e DR. Os estudos *in silico* demonstraram capacidade em provocar resposta por células -T e -B sem respostas alérgicas, tóxicas ou autoimunes (JAIN; BARANWAL, 2019).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vírus ebola (EBOV) é um agente potencialmente fatal e causador da febre hemorrágica do ebola. Basicamente, apresenta altas taxas de mortalidade em surtos epidêmicos devido ser uma zoonose recorrente, bem como, ser potencializada pela culturada população afetada, principalmente, em países africanos. Apesar das pontuais ocorrências da doença pelo mundo com altos índices de mortalidade, é notável o esforço das autoridades sanitárias no controle da doença. Vários laboratórios ao redor do mundo investem em pesquisa para tratamento, mesmo alguns desses se expondo ao alto risco no armazenamento de amostras para testes desse agente. Visto isso, é evidente a relevância do estudo no tratamento da doença causada pelo EBOV pela comunidade científica em todo o mundo.

Para elaboração do atual trabalho, foram consultados artigos científicos tratando de compostos estudados no tratamento do EBOV. Foi possível contemplar estudos envolvendo compostos naturais, sintéticos, estratégias imunológicas e compostos sem alvo específico definido. Ocorreram com maior frequência estudos acerca de compostos sintéticos, entre estes, mais frequentemente inibidores da proteína GP e inibidores da síntese de RNA. Ainda sobre os compostos sintéticos, o composto inibidor da proteína GP, o 5-(dietilamino)acetoamida, demonstrou maior capacidade de inibição do EBOV com EC_{50} de 30 nM. O remdesivir, um inibidor da proteína L, demonstrou um EC_{50} de 0,06 nM. O composto 3-deazaneplanocina A, inibidor do RNA viral, demonstrou evitar a forma letal da viremia quando administrada em 2,2 a 20mg/Kg. Dentre os compostos de origem natural, o Silvestrol, extraído da *Aglaia flaveolata*, foi capaz de inibir a replicação do vírus em cultura de células do hepatoma, já os testes com a Citovirina apontaram para redução de 90% da incidência da forma letal do vírus. Acerca dos demais compostos sem alvo específico definido, o brincidofovir merece mais destaque, apresentando um EC_{50} de 0,22 μ M, em cultura celular de diversas linhagens, sendo 8,06 μ M em células *Vero E6*.

Dentre os trabalhos abordados para elaboração do presente estudo, foi possível observar diferentes estratégias e tratamento visando vários alvos moleculares, entretanto é possível destacar três principais classes de compostos, os inibidores da GP, inibidores da síntese de RNA e inibidores da NPC1. Esses alvos, ao longo das pesquisas no tratamento do EBOV, se mostraram muito promissores no combate da doença por EBOV, com destaque especial aos inibidores da proteína GP em função do mecanismo de internalização do vírus na célula, sendo mais frequentemente abordada nos estudos em função dos

resultados já obtidos. Entretanto, a estratégia mais avançada em ensaios clínicos é a imunológica, a vacina está atualmente em teste com seres humanos com resultados muito positivos para o tratamento da doença.

A abordagem imunológica atualmente detém os resultados mais satisfatórios no tratamento da doença, em específico o rVSV-ZEBOV, que atualmente está sendo amplamente testado em humanos e tem demonstrado resultados positivos.

A elaboração do presente trabalho gira em torno da produção acadêmica, agregando conhecimento científico na compilação de informações produzidas acerca do EBOV. Como já citado, o EBOV apesar da sua concentração em determinada região, o potencial infeccioso e letal já mobiliza a comunidade internacional no estudo e controle da doença, dessa forma acredita-se na relevância do tema apesar da aparente distância.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. F. S. VÂNIA FILIPA SANTOS ALMEIDA ÉBOLA : REVISÃO INTEGRADA E ATUALIZADA À LUZ DAS MAIS RECENTES EVIDÊNCIAS. 2015.
- AMAN, M. J. et al. Development of a broad-spectrum antiviral with activity against Ebola virus. v. 83, p. 245–251, 2009.
- BARRIENTOS, L. G. et al. Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein , GP 1 , 2 and inhibits infectivity of Ebola virus. v. 58, p. 47–56, 2003.
- BAUSCH, D. G. et al. Treatment of Marburg and Ebola hemorrhagic fevers : A strategy for testing new drugs and vaccines under outbreak conditions. v. 78, p. 150–161, 2008.
- BECK, S. et al. Identification of entry inhibitors of Ebola virus pseudotyped vectors from a myxobacterial compound library. v. 132, p. 85–91, 2016.
- BIEDENKOPF, N. et al. The natural compound silvestrol is a potent inhibitor of Ebola virus replication. **Antiviral Research**, v. 137, p. 76–81, 2017.
- BRAY, M. et al. 3-Deazaneplanocin A induces massively increased interferon- α production in Ebola virus-infected mice. v. 55, p. 151–159, 2002.
- BRAY, M.; DRISCOLL, J.; HUGGINS, J. W. Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S -adenosyl- L -homocysteine hydrolase inhibitor. v. 45, n. 86, p. 135–147, 2000.
- BROWN, C. S.; MEPHAM, S.; SHORTEN, R. J. Ebola Virus Disease: An Update on Epidemiology, Symptoms, Laboratory Findings, Diagnostic Issues, and Infection Prevention and Control Issues for Laboratory Professionals. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 269–284, 2017.
- BURKE, J.; DECLERQ, R.; GHYSEBRECHTS, G. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. Report of an international commission. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 56, n. 2, p. 271–293, 1978.
- CHANG, J. et al. Small molecule inhibitors of ER α -glucosidases are active against multiple hemorrhagic fever viruses. **Antiviral Research**, v. 98, n. 3, p. 432–440, 2013.
- CHENG, H. et al. Identification of a coumarin-based antihistamine-like small molecule as an anti- viral entry inhibitor. **Antiviral Research**, v. 145, p. 24–32, 2017.
- CLÉMENT, C.; ADHIKARI, N. K. J.; LAMONTAGNE, F. Evidence-Based Clinical Management of Ebola Virus Disease and Epidemic Viral Hemorrhagic Fevers. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 247–264, 2019.
- DAINO, G. L. et al. Identification of Myricetin as an Ebola Virus VP35-Double-Stranded

- RNA Interaction Inhibitor through a Novel Fluorescence-Based Assay. **Biochemistry**, v. 57, n. 44, p. 6367–6378, 2018.
- FALASCA, L. et al. Molecular mechanisms of Ebola virus pathogenesis: Focus on cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 8, p. 1250–1259, 2015.
- FAN, H. et al. Selective inhibition of Ebola entry with selective estrogen receptor modulators by disrupting the endolysosomal calcium. **Nature Publishing Group**, n. January, p. 1–13, 2017.
- FLINT, M. et al. A genome-wide CRISPR screen identifies N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase as a potential antiviral target for Ebola virus. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019.
- FU, X. et al. Novel Chemical Ligands to Ebola Virus and Marburg Virus Nucleoproteins Identified by Combining Affinity Mass Spectrometry and Metabolomics Approaches. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–13, 2016.
- GARCÍA-DORIVAL, I. et al. Elucidation of the ebola virus VP24 cellular interactome and disruption of virus biology through targeted inhibition of host-cell protein function. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 11, p. 5120–5135, 2014.
- GARRISON, A. R. et al. The cyanobacterial lectin scytovirin displays potent in vitro and in vivo activity against Zaire Ebola virus. **Antiviral Research**, v. 112, p. 1–7, 2014.
- GEISBERT, T. W. et al. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa / tissue factor : a study in rhesus monkeys. v. 362, p. 1953–1958, 2003.
- GOLDSTEIN, T. et al. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. **Nature Microbiology**, 2018.
- HENAO-RESTREPO, A. M. et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. v. 386, p. 857–866, 2015.
- HODGE, T. et al. Antiviral effect of ranpirnase against Ebola virus. **Antiviral Research**, v. 132, p. 210–218, 2016.
- HUNT, C. L.; LENNEMANN, N. J.; MAURY, W. Filovirus entry: A novelty in the viral fusion world. **Viruses**, v. 4, n. 2, p. 258–275, 2012.
- ICHIYAMA, K. et al. Cooperative Orthogonal Macromolecular Assemblies with Broad Spectrum Antiviral Activity, High Selectivity, and Resistance Mitigation. **Macromolecules**, v. 49, n. 7, p. 2618–2629, 2016.
- IKEGAMI, T. et al. Genome structure of Ebola virus subtype Reston: Differences among Ebola subtypes. **Archives of Virology**, v. 146, n. 10, p. 2021–2027, 2001.

- JAHRLING, P. B. et al. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. **The Lancet**, v. 335, n. 8688, p. 502–505, 1990.
- JAIN, S.; BARANWAL, M. **Computational analysis in designing T cell epitopes enriched peptides of Ebola glycoprotein exhibiting strong binding interaction with HLA molecules**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2019. v. 465
- JUAN-GINER, A. et al. Safety of the rVSV ZEBOV vaccine against Ebola Zaire among frontline workers in Guinea. **Vaccine**, v. 37, n. 48, p. 7171–7177, nov. 2019.
- LAVECCHIA, A.; GIOVANNI, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 23, p. 2839–2860, jun. 2013.
- LI, H. et al. Development of therapeutics for treatment of Ebola virus infection. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 2, p. 109–117, 2015.
- LIU, C. et al. 6'-Fluoro-3-deazaneplanocin: Synthesis and antiviral properties, including Ebola. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 23–24, p. 3674–3675, 2018a.
- LIU, H. et al. Identification of Potent Ebola Virus Entry Inhibitors with Suitable Properties for in Vivo Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 14, p. 6293–6307, 2018b.
- LUTHRA, P. et al. A high throughput screen identifies benzoquinoline compounds as inhibitors of Ebola virus replication. **Antiviral Research**, n. 2018, 2017.
- MADELAIN, V. et al. Ebola Virus Infection: Review of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Considered for Testing in Human Efficacy Trials. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 55, n. 8, p. 907–923, 2016.
- MEDICAL, S. A. Management of oesophageal perforation. n. August, p. 539–540, 1977.
- MEHEDI, M. et al. A New Ebola Virus Nonstructural Glycoprotein Expressed through RNA Editing. **Journal of Virology**, v. 85, n. 11, p. 5406–5414, jun. 2011.
- MÉRENS, A.; BIGAILLON, C.; DELAUNE, D. Ebola virus disease: Biological and diagnostic evolution from 2014 to 2017. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 48, n. 2, p. 83–94, 2018.
- MIRANDA, M. E. et al. Epidemiology of Ebola (Subtype Reston) Virus in the Philippines, 1996. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. s1, p. S115–S119, 1999.
- MOGHADAM, S. R. J. et al. Ebola viral disease: A review literature. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 4, p. 260–267, 2015.
- Monkey Meat and the Ebola Outbreak in Liberia**. VICE News, , 2014.
- MUÑOZ, A. et al. glycofullerenes as potent inhibitors in a model of Ebola virus infection. v. 8, n. November 2015, 2016.

- OLINGER, G. G. et al. The lipid moiety of brincidofovir is required for in vitro antiviral activity against Ebola virus * sar Albari n. v. 125, 2016.
- OPSENICA, I. et al. A Chemotype That Inhibits Three Unrelated Pathogenic Targets : The Botulinum Neurotoxin Serotype A Light Chain , P . falciparum Malaria , and the Ebola Filovirus. p. 1157–1169, 2011.
- PANCHAL, R. G. et al. Identification of an antioxidant small-molecule with broad-spectrum antiviral activity. **Antiviral Research**, v. 93, n. 1, p. 23–29, 2012.
- PENNY, C. J. et al. Mining of Ebola virus entry inhibitors identifies approved drugs as two-pore channel pore blockers. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 7, p. 1151–1161, 2019.
- REWAR, S.; MIRDHA, D. Transmission of Ebola virus disease: An overview. **Annals of Global Health**, v. 80, n. 6, p. 444–451, 2014.
- RIVERA, A.; MESSAOUDI, I. Molecular mechanisms of Ebola pathogenesis. v. 100, n. November, 2016.
- SCHNEIDER-FUTSCHIK, E. K. et al. Contemporary Anti-Ebola Drug Discovery Approaches and Platforms. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 35–48, 2019.
- SELAKOVIĆ, Ž. et al. Second generation of diazachrysenes: Protection of Ebola virus infected mice and mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 32–50, 2019.
- SHEARS, P.; O'DEMPSEY, T. J. D. Ebola virus disease in Africa: Epidemiology and nosocomial transmission. **Journal of Hospital Infection**, v. 90, n. 1, p. 1–9, 2015.
- SHRIVASTAVA, S. R. B. L.; SHRIVASTAVA, P. S.; RAMASAMY, J. Ebola disease: An international public health emergency. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 4, p. 253–262, 2015.
- TAWA, G. et al. Identification of 53 compounds that block Ebola virus-like particle entry via a repurposing screen of approved drugs. n. November, 2014.
- TRONCOSO, A. Ebola outbreak in West Africa: A neglected tropical disease. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 4, p. 255–259, 2015.
- VERDONCK, S. et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of 3,5-Disubstituted-pyrrolo[2,3-b]pyridines as Inhibitors of Adaptor-Associated Kinase 1 with Antiviral Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 5810–5831, 2019.
- WARFIELD, K. L. et al. Gene-Specific Countermeasures against Ebola Virus Based on Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers. v. 2, n. 1, 2006.
- WARREN, T. K. et al. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola

- virus in rhesus monkeys. **Nature**, v. 531, n. 7594, p. 381–385, 2016.
- WHO. Ebola Reston in pigs and humans, Philippines. **Weekly Epidemiological Record**, v. 84, n. 7, p. 49–50, 2009.
- WONG, S. S. Y.; WONG, S. C. Y. Ebola virus disease in nonendemic countries. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 114, n. 5, p. 384–398, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Ebola haemorrhagic fever, South Africa. **Weekly Epidemiological Record**, v. 71, n. 47, p. 359, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **New Ebola outbreak detected in northwest Democratic Republic of the Congo; WHO surge team supporting the response**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/01-06-2020-new-ebola-outbreak-detected-in-northwest-democratic-republic-of-the-congo-who-surge-team-supporting-the-response>>. Acesso em: 2 jun. 2020.
- YANG, S. et al. Emetine inhibits Zika and Ebola virus infections through two molecular mechanisms : inhibiting viral replication and decreasing viral entry. **Cell Discovery**, p. 1–14, 2018.
- YERMOLINA, M. V. et al. Discovery, synthesis, and biological evaluation of a novel group of selective inhibitors of filoviral entry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 765–781, 2011.
- ZHANG, X. et al. Characterization of the inhibitory effect of an extract of *Prunella vulgaris* on Ebola virus glycoprotein (GP) -mediated virus entry and infection. **Antiviral Research**, v. 127, p. 20–31, 2016.
- ZHAO, Y. et al. virus glycoprotein. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 169–172, 2016.