ESTUDO IN SILICO COMO BIOMARCADORES DA GLICOPROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2

Thereza D'Ávila Uchôa Da Silva[1]
Aluisio Marques Da Fonseca [2]

RESUMO

Os recentes avanços tecnológicos têm estimulado a pesquisa de novos materiais para os mais diversos tipos de aplicações na área da saúde. O Sars-CoV-2, causador da Covid-19, é uma infecção viral recente e gerou um dos maiores problemas mundiais de todos os tempos. Este trabalho almeja realizar um estudo in silico da síntese de complexos com o lantanídeo Európio (Eu3+), [Eu(TTA)3.xL], com HTTA= tenoiltrifluoroacetona, L= amoxicilina e nitazoxanida. Baseado na escolha de três proteínas para estudo, sendo estas; 7A4N, 7A93 e 7B62. O estudo de simulação de docking molecular será feito com o código AutoDocking Vina, por meio do algoritmo genético lamarckiano (GA) combinado com a estimativa de energia baseada em grade em conformação rígida e flexível. Para a escolha das melhores poses na simulação, será utilizado o parâmetro de rede neural, NNScore2. Com intuito de verificar o comportamento dinâmico do sistema molecular, por meio do software NAMD será realizado também um estudo de dinâmica molecular. Pode-se afirmar que este estudo ainda é introdutório, mas pode ser promissor na identificação/marcação do vírus devido as propriedades fotoluminescentes do Európio, contribuindo com o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos oriundos de fontes sintéticas e renováveis, abrindo novas perspectivas para aplicações biomédicas. O foco inicial deste estudo visa a compreensão dos mecanismos de interação molecular receptor-ligante, estudo de proteínas e a racionalização de como o fármaco com potencial biológico interage neste processo, além de ser um dos principais desafios da química medicinal, é um dos aspectos centrais para o sucesso e planejamento de novos fármacos dentro da área de desenho racional de drogas.

Palavras-chave: receptor; ligante; acoplamento molecular; coronavírus.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - Unilab , Instituto de Ciências da Saúde, Discente, davilaunilab94@gmail.com[1]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, ICEN - Instituto de Ciências Exatas e da Natureza , Docente, aluisiomf@unilab.edu.br[2]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

O novo coronavírus (CoV), identificado como o vírus COVID-19, é o agente etiológico responsável pelo surto de pneumonia viral (ZHU et al, 2020). O uso da química computacional no processo de desenvolvimento de novos fármacos ou estudo de interações moleculares em relação ao avanço do coronavírus (CoV), vem aprimorando e reduzindo os custos e o tempo, comparado com procedimentos experimentais. Como foco inicial este estudo visa a compreensão dos mecanismos de interação molecular receptor-ligante e a racionalização de como o fármaco com potencial biológico interage neste processo, além de ser um dos principais desafios da química medicinal, é um dos aspectos centrais para o sucesso e planejamento de novos fármacos dentro da área de desenho racional de drogas. Nesse contexto, ferramentas de bioinformática para construção, simulação e análise de estruturas 3D tornam-se fundamentais, como a Chem3D, ChemDraw, ChemScketch e outros. As conformações geradas virtualmente são usadas para aproximar a energia livre de ligação (ΔG) ou relacionadas com a afinidade do composto (AZEVEDO, DIAS, et al., 2009). Ao fazer isso, a interação bioquímica da proteína-alvo com o possível ligante, com caraterística de agonista, antagonista, pode alterar/impedir (inibir), agindo assim, como potenciais inibidores e consequentemente, possíveis bloqueadores (GUAN et al, 2020). Além dos imunizantes, a indústria farmacêutica busca métodos mais rápidos para identificar esse vírus no organismo, através de biomarcadores. Em relação aos tipos de marcadores eles podem ser dos mais variados, tais como físicos, histológicos e anatômicos, podendo ser moléculas ou complexos. A nível físico, os biomarcadores podem ser de exposição, de efeito e de suscetibilidade, os quais são ferramentas que tornam possível a identificação de toxicidade ou condição adversa antes que tenham indícios de danos à saúde (AMORIM, 2003). Foram selecionados 3 proteinas; 7A4N, 7A93 com foco de estudo a 7B62. Este projeto visa realizar a síntese do complexo de európio (Eu) com um estudo in silico por meio de docking e dinâmica molecular de sua interação com os resíduos de aminoácidos da glicoproteína Spike do Sars-Cov-2 para verificar sua estabilidade em função do tempo e outras variáveis. Propondo então, que ele possa ser usado como biomarcador na identificação do vírus.

METODOLOGIA

Para o desenvolvimento das atividades, foram utilizados ferramentas metodológicas de biotecnológia para construção, simulação e análise de estruturas 3D. Como a Chem3D, ChemDraw, ChemScketch, pymol, Avogadro, Discovery, vina e outros. As conformações geradas virtualmente são usadas para aproximar a energia livre de ligação (ΔG) ou relacionadas com a afinidade do composto (AZEVEDO, DIAS, et al., 2009). Ao fazer isso, a interação bioquímica da proteína-alvo com o possível ligante, com caraterística de agonista, antagonista, pode alterar/impedir (inibir), agindo assim, como potenciais inibidores e consequentemente, possíveis bloqueadores (GUAN et al, 2020). Dessa forma, o projeto prosperou-se a apartir da realização de encontros semanais com o grupo de pesquisa, sobre orientação do professor responsável, para treinamento nos softwares. Inicialmente, para o desenvolvimento das atividades da pesquisa, o professor orientador, solicita a instalação dos softwares no computador. Onde, a partir deste principiante, é seguido uma ordem cronológica de ambientalização com os programas até o manejo dos mesmos. Ocorrendo da seguinte forma: 1. Utilização dos softwares e aplicabilidade de cada um. 2. Correlacionar a funcionalidade dos softwares com o plano do projeto. 3. Inteira-se dos sites que fornecem os dados necessários para a pesquisa, como dados moleculares do National Center for Biotechnology Information, encontrados no PubChem e o PDB importante banco de dados em 3D sobre proteínas e ácidos nucleicos. 4. Seleção de proteínas para estudos e testes moleculares (7B62, 7a4n e 7a93). 5. A conformação para salvar os dados moleculares e posteriormente usa – los para dinâmica. 6. O habito de manuseiar os softwares ao qual exige muito treinamento para preparação do alvo molecular, do ligante e a análise da energia de interação, como também observar se a condições

ISSN: 2447-6161

favoráveis ou não. 7. Leitura de artigos científicos que dissertam sobre a temática auxiliando na compreensão e desenvolvimento do projeto. 8. Elaboração da fase introdutória para futuras publicações em artigos. 9. Participação em submissão de trabalhos cientificos. 10. Participação no Curso livre II Workshop de Modelagem Computacional e Desenho de Fármaco da FIOCRUZ Ceará da Fundação Oswaldo Cruz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a investigação biotecnologia da interação receptor-ligante foram listados 3 tipos de proteínas spike SARS-COV-2 com conformidades distintas, afim de analisar a modelagem mais adequada. 1. Proteína 7A4N, estrutura Cryo-EM de um SARS-CoV-2 Spike estabilizado por pré-fusão (D614N, R682S, R685G, A892P, A942P eV987P) (trímero S-fechado). Esta proteína é o centro primordial para desenvolvimento de vacinas, implicando nas características imunogênicas. Sua estrutura de pré-fusão fechada dobrada, a proteína S encontra-se altamente estável, produzida, sendo a base para o desenvolvimento de vacinas e diagnósticos sorológicos (JURASZEK et al., 2021). 2. Proteína 7A93 Glicoproteína de pico SARS-CoV-2 com 2 RBDs eretos. Compreende que a infecção é iniciada pela ligação do vírus aos receptores de superfície celular ACE2, logo após, pela fusão do vírus e das membranas celulares para liberar o genoma do vírus na célula. Essas atividades de ligação ao receptor e de fusão da membrana são mediadas pela glicoproteína pico do vírus. Dessa forma, é analisado a ligação de ACE2 à forma clivada de furina da proteína spike SARS-CoV-2 usando microscopia crioeletrônica, permitindo a observação dos átomos dentro das proteínas, possibilitando o congelamento de amostras, visualização em 3D, sendo um método que corrobora para a compreensão das conformações químicas e desenvolvimento de medicamentos. (BENTON; WROBEL; XU; ROUSTAN; MARTIN; ROSENTHAL; GAMBLIN, 2020) e a Proteína 7B62, ao qual nos detemos a pesquisa, esta possui estrutura cristalina do domínio N-terminal da proteína spike SARS-CoV-2 em complexo com biliverdina. Compreende-se que o pico de SARS-CoV-2 se liga à biliverdina e à bilirrubina, em conformações fisiológicas, a biliverdina diminuiu consideravelmente a reatividade do pico de SARS-CoV-2 com soros imunes e inibiu um subconjunto de anticorpos neutralizantes. (ROSA; GRAHAM; MUIR; NG; PARKER; SANTOS; SUSANA; RHYS; NANS; ULFERTS, 2021). A molécula alvo, da glicoproteína Spike S do SARS-CoV-2, síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2, nela está contida o Bla que é o ligante nativo, ao qual é retirado, para um possivel acoplamento com outro ligante, feito um recorte do Bla, visualiza-se suas composições e seus sítios de ligações. Para a análise de energia livre de ligante e receptor foi necessário a realização de docking, onde mostrou-se os fragmentos do ligante nativo Bla com a glicoproteína Spike – 7B62 indicando ligações apropriadas.

CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados, encontrou-se dificuldade no campo tecnológico, visto que o equipamento de uso discente, não supria todas as necessidades de um estudo tão cmplexos, envolvendo diversos softwares, no entanto, a proposta da pesquisa foi alcançada baseada na glicoproteína 7B62, ao qual apresentou em sua análise a melhor energia livre de ligante e receptor, sinalizando ligações apropriadas.

ISSN: 2447-6161

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Cientifica (PIBIC) pelo financiamento da pesquisa. Ao orientador do projeto, Prof. Dr. Aluisio Marques da Fonseca pela orientação prestada ao ensino e pesquisa.

REFERÊNCIAS

Abdelnour, S. A.; Abd El-Hack, M. E.; Khafaga, A. F.; Noreldin, A. E.; Arif, M.; Chaudhry, M. T.; Losacco, C.; Abdeen, A.; Abdel-Daim, M. M. Impacts of Rare Earth Elements on Animal Health and Production: Highlights of Cerium and Lanthanum. Science of the Total Environment. 2019. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.270.

AHMADI, M.; et al, Chem3D 15.0 User Guide. Macromolecules 2005, 24 (2), 1–61.

ALVAREZ, D. E. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. Novartis Foundation Symposium, v. 277, p. 120-132, 2006.

AZEVEDO, W. F. et al. Bioinformatics tools for screening of antiparasitic drugs. Curr Drug Targets, 10(3), mar 2009. 232-9.

AZEVEDO, W. F.; DIAS, R. Computational methods for calculation of ligand- binding affinity. Current Drug Targets, 9, 2009. 1031-1039.

Benton DJ, Wrobel AG, Xu P, et al. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. Nature. 2020;588(7837):327-330. doi:10.1038/s41586-020-2772-0.

Berger I, Schaffitzel C. The SARS-CoV-2 spike protein: balancing stability and infectivity. Cell Res. 2020;30(12):1059- 1060. doi:10.1038/s41422-020-00430-4.

BEYRER., C. et al. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. Lancet, 370, 2007. 619-627.

Biovia. Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5. Accelrys Software Inc. San Diego 2015.

BÖHM, H. J. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a proteinligand complex of known three-dimensional structure. J. Comput. Aid. Mol. Des., 8(3), 1994. 243-56.

BUREAU, R. et al. Molecular Design Based on 3D-Pharmacophore. Application. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 42(4), 2002. 962-967.

CÂMARA, F. P. et al. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 40(2), p. 192-196, 2007.

Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K. Electronic Energy Levels of the Trivalent Lanthanide Aquo Ions. IV. Eu 8+. J. Chem. Phys. 1968, 49 (10). https://doi.org/10.1063/1.1669893.

Carnall, W.; Crosswhite, H. M. Energy Level Structure and Transition Probabilities in the Spectra of the Trivalent Lanthanides in LaF3. Argonne National Laboratory Report. 1978, p Unnumbered.

CARNEIRO, A. C. A. et al. Análise do envolvimento da proteína NS1 deAnálise do envolvimento da proteína NS1 de Dengue Dengue Dengue Dengue Dengue Dengue Dengue virusvirusvirusvirusvirus na modulação da atividademodulação da atividademodulação da atividademodulação da atividademodu. Blucher Biochemistry Proceedings, 1, 2015. 68-69.

Chambers JP, Yu J, Valdes JJ, Arulanandam BP. SARS-CoV-2, Early Entry Events. Franciosa G, ed. J Pathog. 2020;2020:1- 11. doi:10.1155/2020/9238696

ISSN: 2447-6161

CHAMBERS, T. J. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting. Vaccine, v. 15(4), p. 1494-14502, 1997.

CHANG, G. J. Molecular biology of dengue virus.. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever., p. 175-197, 1997.

CODDING, P. W.. Structure-Based Drug Design: Experimental and Computational Approaches. [In: NATO ASI Ser, 1998. 289.

Collares, G. B.; Helena, U.; Paulino, M. Aplicações Clínicas Atuais Da Proteína C Reativa. Rev Med Minas Gerais 2006, 16 (4).

Dai LGao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19. Nat Rev Immunol. 2021;21(2):73-82. doi:10.1038/s41577-020-00480-0.

DONALÍSIO, R. N. O dengue no espaço habitado. São Paulo: Editora Humanismo, Ciência e Tecnologia, 1999.

GARCÍA, G. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. International Journal of Infectious Diseases: Official Publication of The International Society for Infectious Diseases, 15 (1), 2011. 38-43.

Gobeil SM-C, Janowska K, McDowell S, et al. D614G Mutation Alters SARS-CoV-2 Spike Conformation and Enhances Protease Cleavage at the S1/S2 Junction. Cell Rep. 2021;34(2):108630. doi:10.1016/j.celrep.2020.108630.

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. J. Med. Chem., 28 (7), 1985. 849857.

GRUNEBERG, S.; STUBBS, M. T.; KLEBE., G. Successful virtual screening for novel inhibitors of human carbonic anhydrase. J. Med. Chem., 45, 2002. 3588-3602.

Guan, W.; Ni, Z.; Hu, Y.; Liang, W.; Ou, C.; He, J.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.; Hui, D. S. C.; Du, B.; Li, L.; Zeng, G.; Yuen, K. Y.; Chen, R.; Tang, C.; Wang, T.; Chen, P.; Xiang, J.; Li, S.; Wang, J. L.; Liang, Z.; Peng, Y.; Wei, L.; Liu, Y.; Hu, Y. H.; Peng, P.; Wang, J. M.; Liu, J.; Chen, Z.; Li, G.; Zheng, Z.; Qiu, S.; Luo, J.; Ye, C.; Zhu, S.; Zhong, N. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N. Engl. J. Med. 2020, 382 (18), 1708–1720. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032.

Guo, Y. R.; Cao, Q. D.; Hong, Z. S.; Tan, Y. Y.; Chen, S. D.; Jin, H. J.; Tan, K. Sen; Wang, D. Y.; Yan, Y. The Origin, Transmission and Clinical Therapies on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak- A n Update on the Status. Mil. Med. Res. 2020, 7, 1–10. https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0.

Guruprasad L. Human SARS CoV-2 spike protein mutations. Proteins Struct Funct Bioinforma. 2021;89(5):569-576. doi:10.1002/prot.26042.

HOLMES, E. C. The evolutionary biology of dengue virus.. Novartis Foundation Symposium, v. v.277, p. 177-187, 2006.

ISSN: 2447-6161