

## AVALIAÇÃO IN SILICO DO FÁRMACO PILOCARPINA CONTRA PROTEÍNA SPIKE ENVOLVIDA NO PROCESSO INFECCIOSO DA SARS-COV-2

**Sabrina Carvalho Melo** (sabrina.carvalho22@hotmail.com) <sup>1</sup>

**Eduardo De Carvalho Carneiro** (educrv2@hotmail.com) <sup>1</sup>

**Gilson Mariano Borges Filho** (gilson\_mbf@hotmail.com) <sup>1</sup>

**Paulo Sérgio de Araujo Sousa** (psergio.araujosousa@gmail.com) <sup>2</sup>

**Jefferson Almeida Rocha** (jeffersonbiotec@gmail.com) <sup>2,3</sup>

**Leiz Maria Costa Vêras** (leiz.veras@gmail.com) <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Humanas, Exatas e da Saúde do Piauí. | IESVAP - Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba LTDA

<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC – UFDPAR.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

### Resumo

**Objetivo:** Analisar *in silico* a interação entre a pilocarpina e a principal proteína de pico, spike, envolvida no processo patológico do coronavírus. **Método:** Foi realizado docking molecular entre pilocarpina e a estrutura 3D da proteína de superfície do SARS-Cov-2, obtidas no Protein Data Bank (PDB) com o código PDB ID: 6VXX. Para o procedimento de encaixe foi empregado o pacote AutoDock Tools versão 1.5.6. 60, em que o receptor foi considerado rígido e o ligante flexível. **Resultados e discussões:** O processo infeccioso do vírus depende inicialmente da ligação entre a célula do hospedeiro e o vírus, sendo esta função decorrente da proteína spike, localizada em sua superfície, permitindo a penetração na célula. Dessa forma, após a docking molecular foi obtido parâmetros de afinidade molecular ideais a partir da interação entre o ligante de pilocarpina com a proteína 6VXX, com interação dos aminoácidos Ala520 e Ser982 do sítio ativo via ponte de hidrogênio. **Conclusão:** A pilocarpina apresentou importante afinidade com a proteína 6VXX, sendo um mecanismo essencial as infecções, podendo ser um alvo terapêutico importante e que vale a investigação *in vivo* para possível aplicabilidade ao combate do SARS-Cov-2.

**Palavras-chave:** Pilocarpina; Doking Molecular; Covid-19.

**Área Temática:** Inovações e Tecnologias no enfrentamento à COVID-19

**Modalidade:** Trabalho completo

O vírus Sars-CoV-2, conhecido como covid-19, é caracterizada por um quadro de síndrome aguda gripal (SARS) que surgiu em dezembro de 2019, em Wuhan na china, e desencadeou uma emergência na saúde pública mundial. Assim, em março de 2020, a Organização Mundial da saúde (OMS), declarou o estado de pandemia, caracterizando a disseminação global da enfermidade. Tal vírus possui uma alta taxa de transmissibilidade e letalidade, sua transmissão ocorre por meio de gotículas salivares e superfícies contaminadas por indivíduos infectados e até o dia 08 de março de 2021, segundo o painel do Coronavírus da Organização Mundial da Saúde (<https://covid19.who.int/>), no momento da redação deste artigo, havia um total de 173.271.769 casos confirmados e 3.733.980 óbitos, decorrentes do COVID-19. (WHO, 2021)

O coronavírus é um vírus envelopado e esférico, obrigatoriamente intracelular, ou seja, necessita de células metabólicas ativas para se replicar, possuindo RNA de fita simples, sendo da família coronaviridae. Seu processo de invasão ao organismo decorre de algumas proteínas características de sua estrutura, entre elas se destaca a glicoproteína Spike (S) e M-pro, além de se destacar uma proteína do hospedeiro, a ECA (enzima conversora de angiotensina). A glicoproteína Spike e N, estão localizada na superfície do vírus, sendo utilizadas para liga-se ao receptor da célula, mediar sua entrada e neutralizar os anticorpos, sendo subdividida em duas unidades: S1 e S2, encarregados pela adsorção e fusão do vírus à membrana, respectivamente. Tal proteína possui tropismo pela célula ECA (enzima conversora de angiotensina) que se localiza, principalmente, no pulmão. Já a glicoproteína M-pro é responsável pelo ciclo de reprodução viral, por meio da tradução do RNA. (Velavan e Meyer, 2020)

Diversos estudos buscam intervir no processo patológico da doença, com a elaboração de fármacos que ajam nas vias bioquímicas e de moléculas alvo. Dentre os fármacos, uma classe que vem expandindo são aqueles sintetizados por meio de plantas e vegetais, chamados de medicamentos fitoterápicos, sendo utilizada para efeitos profiláticos, curativos e paliativos, além de possuir baixo custo e poucos efeitos adversos, sendo um medicamento seguro. Dessa forma, os medicamentos fitoterápicos, que possuem grande diversidade no território brasileiro, podem ser uma alternativa de tratamento. (Braga e Silva, 2021)

A jaborandi, pilocarpus jaborandi, rica na região do maranhão é uma árvore que se destaca na farmacologia filantrópica, com uso intensivo pelas indústrias farmacêuticas, possuindo suas propriedades medicamentosas por meio de três compostos, entre eles a

pilocarpina. Este alcaloide imidazólico, extraído da falha da jaborandi, é um agente agonista colinérgico, que age especialmente nos receptores muscarínicos, ativando o sistema parassimpático. Na clínica, sua maior indicação consiste no tratamento de doenças oculares, como glaucoma e disfunção salivar, xerostomia. (Rocha, Andrade, Vêras et.al, 2017)

Dada a emergência a qual nos encontramos, no cenário pandêmico, ocorre uma corrida contra o tempo para o planejamento de fármacos efetivos contra o covid-19, além do processo de vacinação, que no Brasil se vagaroso. Dessa forma, enfatiza a necessidade de estratégias terapêuticas para minimizar o dano que está sendo causado por tal vírus. Sendo assim, a docagem molecular, é uma ferramenta que consiste em prever interações entre ligantes e receptores, com o intuito de traçar uma correlação de boa interação e elevada atividade biológica entre as moléculas, em que os resultados possuem extrema validade em testes in vivo. Dessa forma, uma vez que ocorre ligações efetivas sobre a molécula alvo, pode-se identificar moléculas terapêuticas para uma patologia, assim, essa ferramenta pode avaliar as propriedades farmacocinéticas, além de possuir manejo rápido. (Franco, Peral e Garcia, 2020)

Dessa forma, devido a ineficácia de medicamentos e tratamentos disponíveis para o Sars-Cov-2, este estudo busca investigar in silico, por meio da docagem molecular, a interação entre a pilocarpina e a proteína Spike, relacionada a invasão do vírus a célula hospedeira.

## 2 MÉTODO

Para a realização desse estudo experimental do processo de docagem molecular, realizada no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC) na Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAR), durante o primeiro semestre de 2021, foram obtidos por meio do Protein Data Bank (PDB) estruturas 3D da proteína de pico do coronavírus (SARS-Cov-2), com o código PDB ID: 6VXX. Para iniciar o procedimento de encaixe foi utilizado o pacote AutoDock Tools (ADT) versão 1.5.6. 60, onde o receptor foi considerado rígido e o ligante foi considerado flexível. Os centros da grade de afinidade foram definidos. O algoritmo genético lamarckiano de busca global (LGA) e os métodos de busca local (LS) pseudo-Solis e Wets foram aplicados na busca do docking.

O ligante foi submetido a 100 execuções independentes de simulações de encaixe. Outros parâmetros de encaixe foram definidos como os valores padrão. As conformações encaixadas resultantes foram agrupadas em famílias de acordo com o RMSD. Para uma análise mais detalhada, as coordenadas dos complexos selecionados foram escolhidas pelo critério de

menor conformação docking do cluster com menor energia em combinação com uma inspeção visual.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o contato com o patógeno através da via área superior, que ocorre devido a contaminação por gotículas salivares e superfície contaminada, o vírus se adere a mucosa epitelial, por meio da proteína viral de superfície, spike e N ao receptor tecidual, conhecida como enzima conversora de angiotensina (ECA-2), localizada no trato respiratório inferior, mediando sua entrada na célula alvo e ocorrendo a replicação viral, por meio da protease M-pro. Assim, o processo patológico se inicia por meio da acoplagem da estrutura de pico (proteína spike) do coronavírus a célula hospedeira, resultando nas repercussões no organismo.

Tento a pilocarpina como uma substância fitoterápica e possível efeito na fisiopatologia do coronavírus foi medido a força de interação entre os ligantes, por meio da docagem molecular, em que foram pesquisados a interação com a proteína Spike, a 6VXX, cuja os resultados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de afinidade molecular da pilocarpina com a proteína 6VXX.

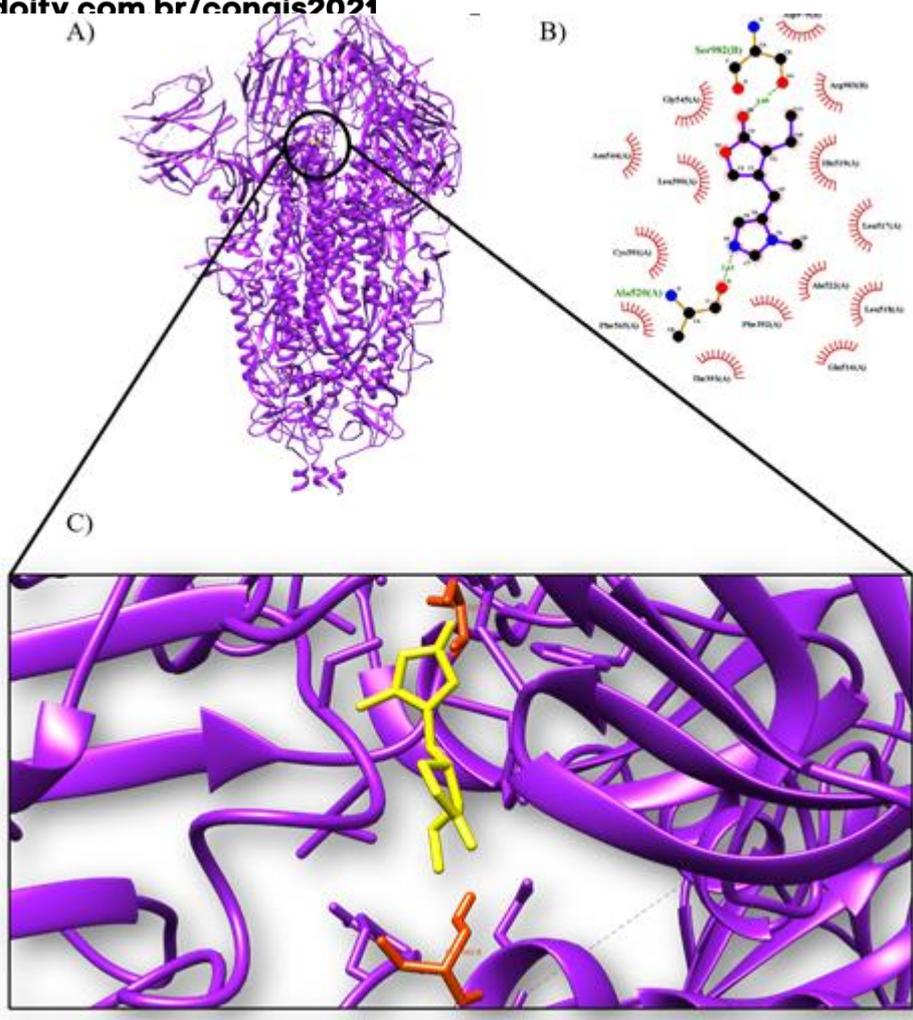
Complex (Ligand-Protein)	$\Delta G_{\text{bind}}^a$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Ki <sup>b</sup>	Amino acids that interact through hydrogen bonds <sup>c</sup>	Amino acids that perform hydrophobic interaction <sup>c</sup>
PILO-6VXX (1° active site)	-5.27	138.21 $\mu\text{M}$	Asp364, Ser373 and Ser371	Phe374, Asn343, Phe342, Phe338, Gly339, Val367 and Leu368
PILO-6VXX (2° active site)	-7.15	5.75 $\mu\text{M}$	Ala520 and Ser982	Gly545, Asn544, Leu390, Cys391, Phe565, Thr393, Phe392, Ala522, Glu516, Leu518, Leu517, His519, Arg983 and Asp979

PILO-6VXX	-4.94	238.58 $\mu\text{M}$	Asp994	Gly971, Arg995, Tyr756, Gly999, Thr998 and Phe970
(3° active site)				

**Fonte:** Autoria própria

Os Parâmetros de afinidade molecular ideais foram obtidos a partir da interação entre o ligante de pilocarpina com a proteína 6VXX, no segundo sítio ativo. A afinidade foi observada com energia de ligação igual a  $-7,15 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e uma constante de inibição de  $5,75 \mu\text{M}$  (Tabela 1; Figura 1). Nos ligantes foi possível observar a interação com os aminoácidos Ala520 e Ser982 do sítio ativo via ponte de hidrogênio.

Figura 1 - Docking molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 6VXX, no segundo sítio ativo, e o ligante pilocarpina ilustrando o sítio de ligação ativo (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



**Fonte:** Autoria própria

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na docagem molecular da pilocarpina com proteína Spike, associada a fisiopatologia do coronavírus, permitiu a análise de afinidades moleculares, o qual foi obtido uma interação ideal entre o ligante de pilocarpina com a proteína 6VXX, localizada na superfície do vírus, responsável pelo acoplamento do vírus a célula hospedeira, e conseqüentemente processo infeccioso.

Dessa forma, a busca e urgência por um tratamento eficaz que diminua a mortalidade do vírus e repercussões sociais e econômicas, traz a importância desse estudo in silício, o qual pode indicar um possível alvo farmacológico associado a pilocarpina. Assim, deve ser complementado em experimentos in vivo, visando analisar as repercussões clínicas.

BEZERRA, W. K. T et al. O uso de fitoterapia com ação anti-inflamatória que atuam no sistema gênito-urinário. **Informativo Técnico do Semiárido**, v. 8, n. 1, p. 24-36, 2014.

BRAGA, J. C, SILVA, L. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, 2021.

BRITO, S. B, BRAGA, I et.al. Mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção por SARS-Cov-2. **J Bras patol med**, 2020.

BÚ, E. A. D et al. Representações e ancoragens sociais do novo coronavírus e do tratamento da COVID-19 por brasileiros. **Estudos de Psicologia (Campinas)**, 2020.

DE OLIVEIRA, E. H. A. Coronavírus: prospecção científica e tecnológica dos fármacos em estudo para tratamento da Covid-19. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 2 COVID-19, p. 412, 2020.

ELDIN, S; DUNFORD, A. **Fitoterapia: na atenção primária à saúde**. Editora Manole Ltda, 2001.

FRANCO, T. G, PERAL, E. M. R, GARCIA, F. The sustainability of the health system and the pharmaceutical market: A permanent interaction between the cost of medications, the patent system, and disease care. **Salud Colect** 16. 19 Apr 2020.

GOODSELL, D. S. Computational docking of biomolecular complexes with Auto-Dock, in: E.A. Golemis, P.D. Adams (Eds.), Protein-protein Interact. A Mol. Cloning Man, Second, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2005.

GUSMÃO, G. M. A. S. Avaliação clínica de formas farmacêuticas sólidas clássicas e mucoadesivas contendo pilocarpina para tratamento da xerostomia em idosos. 2018.

HUEY R, MORRIS G.M, FORLI S. Usando AutoDock4 e AutoDock Vina com AutoDockTools: Um tutorial. O Scripps Research Institute. 2012.  
<https://www.yumpu.com/en/document/view/52169976/using-autodock-4-and-autodockvina-withautodocktools-a-tutorial>.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. Using AutoDock for ligand-receptor docking, in: Curr. Protoc. Bioinforma., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2008.

PEÑA, L, BRIGITTE, O, RINCÓN, O et al. SARS-CoV-2: generalidades bioquímicas e métodos de diagnóstico. Nova, 18 (spe35). 2020.

ROCHA, J. A. et al. Atividade anti-helmíntica, antibacteriana e citotoxicidade de alcalóides imidazol das folhas de *Pilocarpus microphyllus*. **Pesquisa em fitoterapia**, v. 31, n. 4, pág. 624-630, 2017.

ROCHA, J. A. et al. Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198476, 2018.

SANTOS, M. C. Q., & de Araújo, C. R. F. Fitoterapia como alternativa de imunomodulação em idosos em tempos de covid-19. **Envelhecimento baseado em evidências**, 2020.

TAKIUCHI, E, BARREIROS, M. A. B, ALFIERI, A.F et al. Identificação de mutação no sítio de clivagem da proteína spike em cepas brasileiras de coronavírus bovino selvagem. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38 (4), 2007.

VELAVAN, T. P ; MEYER, C. G. The COVID-19 epidemic. **Medicina tropical e saúde internacional** , v. 25, n. 3, pág. 278, 2020.

World Health Organization (WHO). **Coronavirus disease 2021 (COVID-19): situation report**, . [acessado 2021 março 13]. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2021/situation-reports>. 3021.