

**INVESTIGAÇÃO POR DOCAGEM MOLECULAR DA INTERAÇÃO  
ENTRE EPIISOPILOTURINA E CICLOOXIGENASES ENVOLVENDO  
A PATOLOGIA DO SARVS-COV-2**

**Gilson Mariano Borges Filho (gilson\_mbf@hotmail.com)<sup>1</sup>**  
**Eduardo De Carvalho Carneiro (educry2@hotmail.com)<sup>1</sup>**  
**Sabrina Carvalho Melo (Sabrina.carvalho22@hotmail.com)<sup>1</sup>**  
**Paulo Sérgio de Araújo 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:** investigar *in silico* a reatividade e interação da epiisopiloturina com as ciclooxigenases, que possuem função patogênica na infecção por SARS-CoV-2. **Método:** Na docagem molecular, a estrutura 3D das enzimas da ciclooxigenase foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) com o código PDB ID: 6Y3C (COX-1) e 3NT1 (COX-2). Para uma análise mais detalhada, as coordenadas dos complexos selecionados foram escolhidas pelo critério de menor conformação do cluster na docagem com menor energia em combinação com uma inspeção visual. **Resultados:** Parâmetros ótimos de afinidade molecular foram obtidos a partir da interação entre o ligante EPI com a proteína 3NT1, no primeiro sítio ativo. A afinidade foi observada com energia de ligação igual a  $-8.12 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , e uma constante de inibição de  $1.12 \mu\text{M}$  (Tabela 1; Figura 1). Nos ligantes foi possível observar a interação com os aminoácidos G1n370, Ser121, Ile124, G1n372 e Lys532 do sítio ativo via ponte de hidrogênio. **Conclusões:** a epiisopiloturina apresentou boa afinidade pela proteína 3NT1, no primeiro sítio ativo, sendo característica importante no processo de infecção pelo novo coronavírus. Assim, podendo a EPI ser um agente efetivo contra a infecção pelo SARS-CoV-2.

**Palavras-chave:** Novo coronavírus; Docagem molecular; Epiisopiloturina; Ciclooxigenase.

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

**Modalidade:** Trabalho completo

A pandemia do coronavírus 2 (SARS-CoV-2) começou em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan – China. Em janeiro de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS), declarou o novo coronavírus como emergência de saúde pública de interesse internacional. Assim, cientistas e profissionais da saúde ao redor do mundo têm compartilhado seus estudos para identificar o mecanismo patogênico deste vírus. Os estudos indicaram que SARS-CoV-2 é um coronavírus, RNA vírus, com aproximadamente 29.000 pares de bases de nucleotídeos (ZAZA G, 2020).

O vírus foi identificado a primeira vez em pacientes com pneumonia. Sua apresentação clínica, chamada de COVID-19, parece variar de uma doença respiratória leve ou assintomática a grave e fatal, mas sua exata apresentação continua desconhecida. (NEHER RA, 2020). Em geral, o quadro clínico da manifestação inclui fadiga, tosse seca e febre. Pacientes de curso leve, podem apresentar fadiga e febre baixa. Dispneia e hipoxemia ocorre em curso grave após uma semana. Casos críticos são rapidamente progressivos e apresentam complicações como a síndrome do desconforto respiratório agudo, choque séptico, acidose metabólica e refrataria a disfunção de coagulação se desenvolvendo em dias. (LIU K, 2020).

A reação inflamatória é o sintoma mais obvio e a solução depende da rápida expressão do gene pró-inflamatório. A ciclooxigenase (COX) é uma enzima na via biosintética das prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico. As prostaglandinas são importantes para muitos processos biológicos. Duas isoformas são descritas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa em quase todos os tecidos. COX-2 é expressa em resposta a estímulos inflamatórios e outros estímulos fisiológicos e fatores de crescimento, sendo envolvida na produção das prostaglandinas que medeiam a dor e apoiam o processo inflamatório (LIU M, 2007).

A Epiisopiloturina (EPI) é um importante alcaloide imidazólico extraído das folhas da *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae - Jaborandi), encontrado no Brasil. Sendo interessante ressaltar que suas propriedades farmacológicas podem reduzir a COX-2 e reverter a inflamação (C L, 2018).

Assim, nesse cenário de pandemia, pesquisar sobre drogas efetivas contra a COVID-19 é um passo importante para solucionar essa situação caótica. Portanto, usar a docagem

molecular para analisar a farmacocinética e investir interações metabólicas são ações importantes para mudar essa situação.

## 2 MÉTODO

Na docagem molecular, a estrutura 3D das possíveis enzimas da ciclooxigenase humana foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (BERMAN H M, 2000) com o código PDB ID: 6Y3C (COX-1) e 3NT1 (COX-2). Todos os procedimentos de encaixe utilizaram o pacote Autodock 4.2 (GOODSELL D S, 2000), (GOODSELL D S, 2005), (MORRIS G M, 2008). Proteínas e ligantes foram preparados para simulações de docagem com AutoDock Tools (ADT) versão 1.5.6 (SANNER M F, 1999). O receptor foi considerado rígido; cada ligante foi considerado flexível. As cargas parciais de Gasteiger foram calculadas após a adição das quedas de hidrogênio (GASTEIGER J, 1980). Os átomos de hidrogênio apolares da proteína e do ligante foram posteriormente fundidos. Uma caixa cubica de 60 x 60 x 60 pontos com espaçamento de 0,35 Å entre os pontos da grade foram gerados para a proteína alvo. Os centros da grade de afinidade foram definidos. O algoritmo genético lamarckiano de busca global (LGA) (MORRIS G M, 1998) e a busca local (LS) (SOLIS F J, 1981) pseudo-solido e seus métodos foram aplicados na busca da docagem. Cada ligante foi submetido a 100 execuções independentes de simulações de acoplamento (ROCHA J A, 2018). Outros parâmetros de docagem foram definidos como padrão. As conformações encaixadas 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 do cluster na docagem com menor energia em combinação com uma inspeção visual.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos a docagem molecular do composto da epiisopiloturina (EPI) com as proteínas 6Y3C e 3NT1 são apresentadas na tabela 1. Parâmetros ótimos de afinidade molecular foram obtidos a partir da interação entre o ligante EPI com a proteína 3NT1, no primeiro sitio ativo. A afinidade foi observada com energia de ligação igual a  $-8.12 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , e uma constante de inibição de  $1.12 \mu\text{M}$  (Tabela 1; Figura 1). Nos ligantes foi possível observar a interação com os aminoácidos G1n370, Ser121, Ile124, G1n372 e Lys532 do sitio ativo via ponte de hidrogênio. Além disso, a afinidade molecular da EPI com 6Y3C (Tabela 1; Figura 2), com energia de ligação igual a  $-7.48 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e uma constate de inibição de  $3.31 \mu\text{M}$ . Foi observada interação com os aminoácidos Met522 e Arg120 do sitio ativo.

Tabela 1. Parâmetros de afinidade molecular da EPI com as proteínas 3NT1 e 6Y3C.

Complexo (Ligante- Proteína)	$\Delta G_{bind}^a$ (kcal.m ol <sup>-1</sup> )	$K_i^b$	Aminoácidos que interagem por meio de ligações de hidrogênio	Aminoácidos que realizam interação hidrofóbica c
EPI-3NT1 (1° active site)	-8.12	1.12 $\mu$ M	Gln370, Ser121, Ile124, Gln372 e Lys532	Thr118, Tyr122, Gln543, Phe371, Pro542 e Ser126
EPI-3NT1 (2° active site)	-6.28	24.77 $\mu$ M	Gln192 e Asn581	Asp515, Gln350, His351, Asp347, Phe580, Ser579 e Gly354
EPI-6Y3C	-7.48	3.31 $\mu$ M	Met522 e Arg120	Leu384, Ser353, Leu359, Val116, Tyr355, Val349, Leu531, Ala527, Gly526, Ile523, Tyr385, Phe518, Ser530, Phe381 e Trp387

<sup>a</sup> Ligação de força na melhor combinação; <sup>b</sup> Melhor conformação da constante de inibição; <sup>c</sup> Obtido com o programa Ligplot.

Figura 1 – Docagem molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 3NT1, no primeiro sitio ativo, proteína e ligante EPI ilustrando o sítio de Ligação ativo (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).

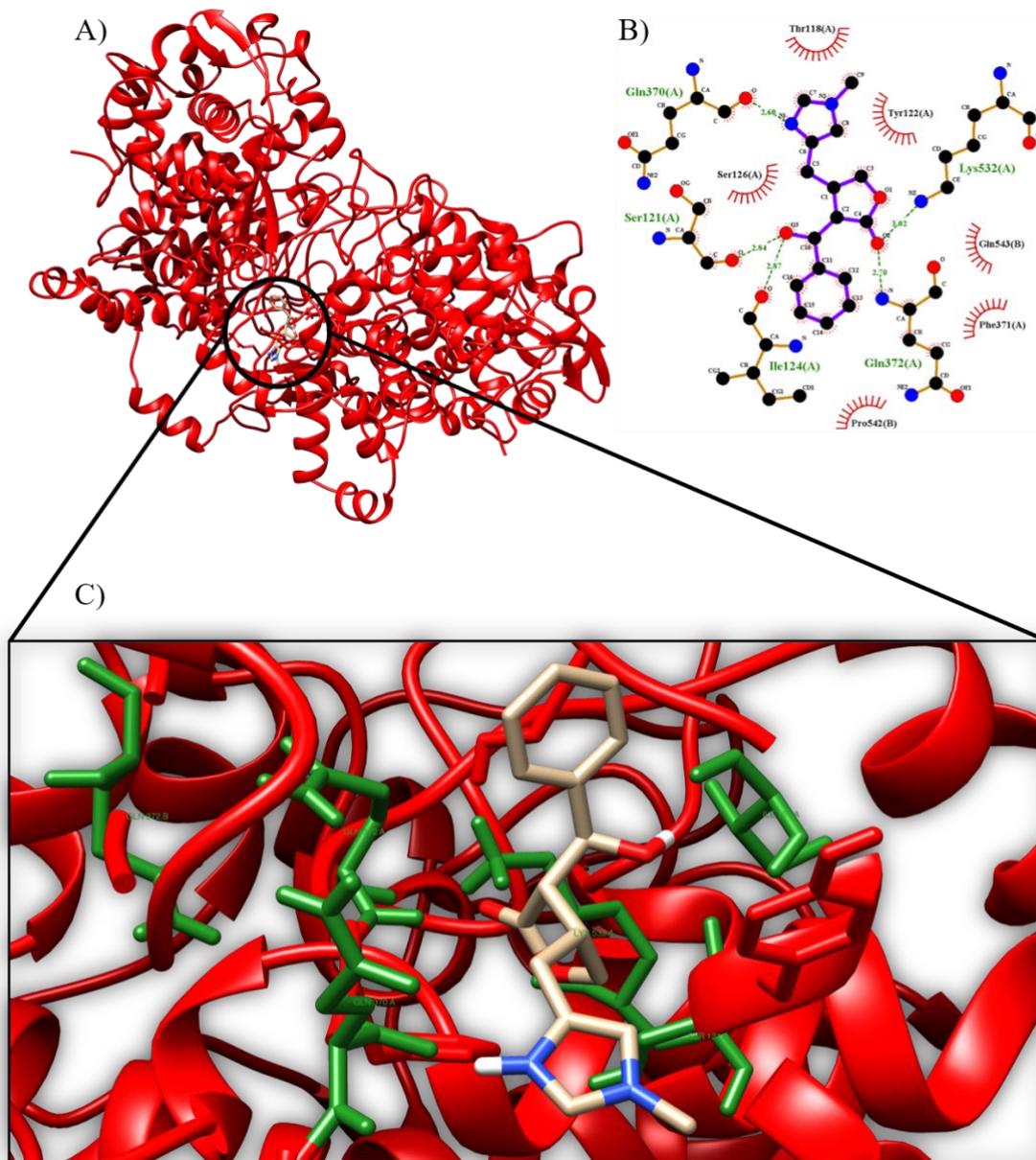
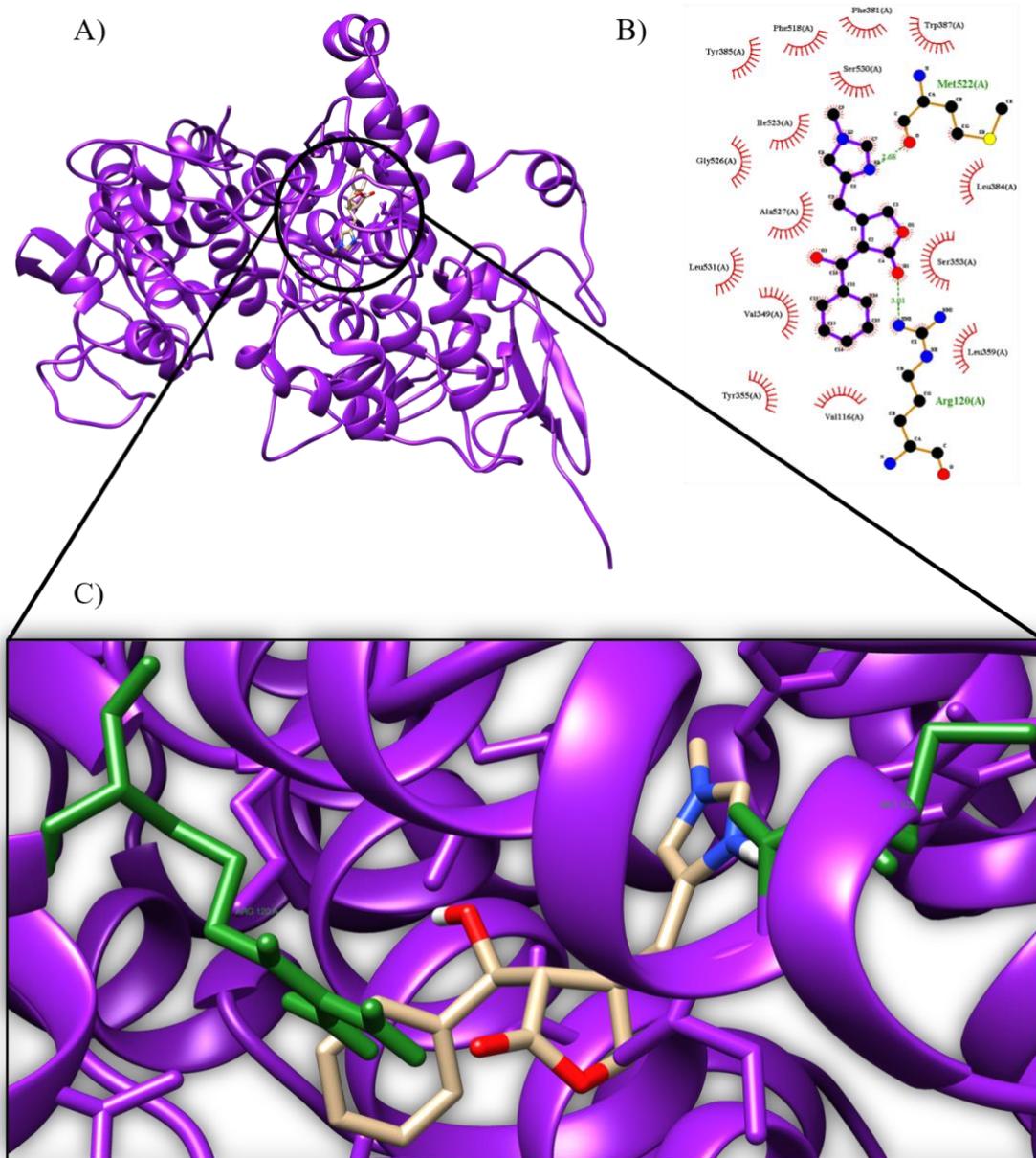


Figura 2 – Docagem molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 6Y3C e ligante EPI ilustrando o sítio de Ligação ativo (A e B) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



#### 4 CONCLUSÃO

Observa-se que os resultados obtidos na docagem molecular entre a EPI com a proteína 3NT1 alcançaram alto grau de afinidade no primeiro sitio ativo. Afinidade destacada por energia de ligação igual a  $-8.12 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e uma constante de inibição de  $1.12 \mu\text{M}$ .

A 3NT1 é identificada no PDB como a ciclooxigenase 2 (COX-2), enzima importante nos processos biológicos. Esta enzima por estar envolvida na produção das prostaglandinas e por apoiar o processo inflamatório, que é presente no COVID-19, e principalmente por ser

exacerbado com a infecção do novo coronavírus mostra-se como ponto importante a ser neutralizado durante infecção pelo vírus.

Portanto, a EPI por possuir alto grau de afinidade/acoplamento pela COX-2, pode ser um agente efetivo contra a infecção do SARVS-CoV-2. Sendo assim, é importante dar continuidade aos estudos desse alcaloide e posteriormente testar *in vitro* e *in vivo*. Vale destacar, que por ser um material acessível, e abundante na natureza, torna-se alternativa ideal para o combate da pandemia.

## REFERÊNCIAS

Zaza, G., Benedetti, C., Fribourg, M., Maggiore, U., Azzi, J., Riella, L.V. and Cravedi, P. (2020), SARS-CoV-2 pandemic and the need for transplant-oriented trials. *Transpl Int*, 33: 966-968. <https://doi.org/10.1111/tri.13626>

Neher RA, Dyrdak R, Druelle V, Hodcroft EB, Albert J. Potential impact of seasonal forcing on a SARS-CoV-2 pandemic. *Swiss Med Wkly*. 2020 Mar 16;150:w20224. doi: 10.4414/smw.2020.20224. PMID: 32176808.

Liu K, Pan M, Xiao Z, *et al* Neurological manifestations of the coronavirus (SARS-CoV-2) pandemic 2019–2020 *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020;**91**:669-670.

Liu, M., Yang, Y., Gu, C., Yue, Y., Wu, K.K., Wu, J. and Zhu, Y. (2007), Spike protein of SARS-CoV stimulates cyclooxygenase-2 expression *via* both calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C pathways. *The FASEB Journal*, 21: 1586-1596. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6589com>

Rodrigues de Carvalho L, de Brito TV, Simião da C Júnior J, et al. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenosulfonic acid in Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 2018 Jun;102:278-285. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.090.

Rocha, J.A.; Rego, N.C.S.; Carvalho, B.T.S.; Silva, F.I.; Sousa, J.A.; Ramos, R.M. et. Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. *Plos. One*. 2018, 13, e0198476.

Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic. Acids. Res*. 2000, 28, 235–242.

Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. *J. Mol. Recognit*. 1996, 9, 1-5.

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.

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.

Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. J. Mol. Graph. Model. 1999, 17, 57-61.

Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electro- negativity da rapid access to atomic charges. Tetrahedron. 1980, 36, 3219-3228.

Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comput. Chem. 1998, 19, 1639-1662.

Solis, F. J.; Wets, R. J. B. Minimization by Random Search Techniques. Math. Oper. Res. 1981, 6, 19-30.