

1. IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

Título do projeto: TRIAGEM VIRTUAL DE MOLÉCULAS NATURAIS COM ATIVIDADE DUAL COMO ANTI-PROTEASE PRINCIPAL DO SARS-COV-2 E ANTI-INFLAMATÓRIAS PULMONARES: ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO*.

Coordenador: Professor Dr. Rafael Matos Ximenes (rafael.ximenes@ufpe.br)

Local de execução:

ETNO – Laboratório de Etnofarmacologia e Fitoquímica

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

Av. Prof. Artur de Sá, SN, Cidade Universitária, 50.740-525 Recife, Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Em virtude da pandemia de COVID-19, doença causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), que já acometeu 2 milhões de pessoas no mundo, com mais de 125 mil obtidos registrados, faz-se necessária a busca por novas moléculas capazes de inibir a replicação viral, bem como de atenuar a inflamação por trás da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS – *Severe Acute Respiratory Syndrome*) (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>).

Por se tratar de uma doença nova, é imprescindível ampliar o conhecimento sobre a epidemiologia, a história natural (período de incubação, formas de transmissão, índice de transmissibilidade), e especialmente quanto opções farmacológicas para o tratamento da COVID-19. Até o momento não existe tratamento farmacológico efetivo (Sanders et al., 2020), mas sabe-se que modular a resposta inflamatória desencadeada pelo vírus é crucial para sobrevivência dos pacientes infectados, contudo o uso de anti-inflamatórios não esteroides e de corticoides já demonstrou trazer mais malefícios do que benefícios aos pacientes, aumentando inclusive a mortalidade (Zhou et al., 2020). Estudos mostram que outros tipos de coronavírus, como o SARS-CoV e o MERS-CoV, induzem a expressão do fator de transcrição NF-κB em células pulmonares tipo II, e que este é responsável por desencadear a resposta inflamatória (Sims et al., 2008).

Dentre as possíveis opções para o tratamento da COVID-19 estão os inibidores de proteases virais, os quais impedem a replicação viral, aliviando os sintomas da doença. Neste contexto, moléculas promiscuas, capazes de se ligar a mais de uma enzima/receptor, são extremamente interessante, se além de inibir as proteases virais também forem capaz de modular a resposta imunológica a doença, seja pela inibição do NF-κB, seja pela inibição da via JAK/STAT (responsável pela transcrição de sinais dos receptores de citocinas) (Stebbing et al., 2020).

A base de dados NuBBE_{DB} (Pilon et al., 2017), desenvolvida pelos pesquisadores do INCT BioNat – Biodiversidade e Produtos Naturais, contém informações químicas e biológicas de mais de 2200 moléculas (metabólitos secundários e seus derivados) oriundas da biodiversidade brasileira. Nesta base é possível selecionar as moléculas pelos organismos produtores, por suas propriedades químicas (classe, estrutura, massa molecular, enquadramento nas regras de Lipinski, etc.), bem como por suas propriedades biológicas/farmacológicas (<https://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbe-search.html>).

Neste contexto, alguns estudos já demonstraram a eficácia de diferentes formulações da Medicina Tradicional Chinesa no alívio dos sintomas da COVID-19 (Runfeng et al., 2020). A justificativa deste projeto está na identificação de moléculas amplamente difundidas na natureza que possam atuar como profiláticas no agravamento dos sintomas da COVID-19, desafiando assim os sistemas de saúde.

3. OBJETIVO

Identificar moléculas naturais a partir da base de dados NuBBEDB com capacidade de inibir a protease principal do SARS-CoV-2 e a resposta inflamatória em células epiteliais pulmonares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Triagem virtual de moléculas naturais

As estruturas químicas da protease principal do SARS-CoV-2 será obtida no Protein Data Bank (Wu et al., 2020). As estruturas cristalográficas obtidas no PDB e a das moléculas naturais (ligantes) serão tratadas para definição das ligações flexíveis. A triagem virtual será realizada utilizando a plataforma DockThor do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) (Santos et al., 2020; Magalhães et al., 2014). Serão analisadas as energias de ligação e as principais interações intermoleculares e conformações dos ligantes ao interagirem com o sítio ativo da enzima. Os ligantes que apresentarem menores valores de energia serão selecionados para análise dos parâmetros farmacocinéticos e testes *in vitro*.

4.2 Predição das características farmacocinéticas dos compostos selecionados

As características farmacocinéticas das moléculas selecionadas serão preditas utilizando a plataforma SwissADME (Daina et al., 2017). Serão avaliadas as propriedades físico-químicas, lipofilicidade (Log P), solubilidade em água (Log S), os preditores de absorção, metabolismo e biodisponibilidade, além do número de violações das regras de Lipinski (*drug-likeness*). As moléculas selecionadas nas duas etapas de triagem virtual serão adquiridas de fornecedores certificados ou doadas pelos pesquisadores do INCT-BioNat, conforme o caso.

4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória pulmonar *in vitro*

4.3.1 Linhagem celular e condições de cultivo

Serão utilizadas células epiteliais pulmonares humanas da linhagem A549 provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células são mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de extrato de pituitária bovina (EPB) a 37 °C e 5% de CO₂. Para os experimentos de citotoxicidade e inflamação pulmonar *in vitro*, as células serão transferidas para placas de 24 poços revestidas previamente com matriz extracelular (MEC) para permitir sua diferenciação em pneumócitos tipo II (Cooper et al., 2016).

4.3.2 Determinação da citotoxicidade dos compostos selecionados

A citotoxicidade das moléculas selecionadas será avaliada nas células A549 não diferenciadas e após diferenciação pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] em concentrações entre 0,1 e 100 µM para cálculo da IC₅₀. As moléculas que obtiverem IC₅₀ > 50 µM serão avaliadas na inibição da inflamação pulmonar *in vitro*.

4.3.3 Viabilidade celular e análise de marcadores inflamatórios por pneumócitos estimulados com LPS por RT-qPCR

Após o protocolo de diferenciação das células A549 em pneumócitos tipo II, estes serão estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, 10 µg/mL) e após 1 h, serão tratados com as moléculas selecionadas em 3 concentrações (0,1, 1 e 10 µM) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 ou 48h. Inicialmente, a viabilidade celular será determinada por citometria de fluxo através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Em um novo experimento, após 6h e 24 h do estímulo inflamatório, as células serão tripsinizadas e agrupadas em microtubos de 1,5 mL para lise e extração do RNA utilizando TRIzol™ (Invitrogen™, EUA). O RNA obtido será utilizado para síntese do cDNA utilizando uma transcriptase reversa. A PCR em tempo real será realizada utilizando um CFX96 Touch (BioRad, EUA). Serão utilizados 25 µL de GoTaq® (Promega, EUA), 200 nM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 1 µL de

cDNA. O número de ciclos e as temperaturas de anelamento e desanelamento serão otimizadas para cada *primer*. Será avaliada a transcrição de diferentes marcadores inflamatórios, como NF- κ B, JAK2, STAT1 e 3, além de mediadores pró-inflamatórios (INF- γ , TNF- α , IL-1 β e MCP-1) e anti-inflamatórios (IL-4, IL-10, IL-1RA). Os resultados (média \pm DP) serão analisados por ANOVA com pós-teste de Bonferroni, considerando significativos valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se encontrar moléculas naturais com afinidade pela protease principal do SARS-CoV-2, que atendam aos requisitos de *drug-likeness* e possuam atividade anti-inflamatória *in vitro* em pneumócitos humanos. Espera-se ainda algumas das moléculas identificados possuam ampla distribuição em plantas medicinais reconhecidamente seguras, de modo que a população possa ser aconselhada a fazer uso dessas espécies para alívio dos sintomas da COVID-19, contribuindo para diminuição da procura ao SUS.

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades previstas	Meses				
	1º	2º	3º	4º	5º
Otimização dos ligantes	X				
Docking molecular	X	X			
Predição das características farmacocinéticas		X			
Estabelecimento e manutenção da cultura de pneumócitos A549	X	X	X	X	
Ensaio de citotoxicidade		X	X		
Atividade anti-inflamatória pulmonar <i>in vitro</i>			X	X	
Elaboração dos relatórios mensais	X	X	X	X	
Elaboração do relatório final e prestação de contas					X

REFERÊNCIAS

- Cooper, J.R.; Abdullatif, M.B.; Burnett, E.C.; Kempell, K.E.; Conforti, F.; Tolley, H.; Collins, J.E.; Davies, D.E. Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. **PLoS ONE**, 11, e0164438, 2016. DOI: [10.1371/journal.pone.0164438](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164438).
- Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, 7, e42717, 2017. DOI: [10.1038/srep42717](https://doi.org/10.1038/srep42717).
- Magalhães, C.S.; Almeida, D.M.; Barbosa, H.J.C.; Dardenne, L.E. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206–224, 2014. DOI: [10.1016/j.ins.2014.08.002](https://doi.org/10.1016/j.ins.2014.08.002).
- Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, 16, p. 2785-2791, 2009. DOI: [10.1002/jcc.21256](https://doi.org/10.1002/jcc.21256).
- Pilon, A.C.; Valli, M.; Dametto, A.C.; Pinto, M.E.F.; Freire, R.T.; Castro-Gamboa, I.; Andricopulo, A.D.; Bolzani, V.S. NuBBE_{DB}: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, 7, e7215, 2017. DOI: [10.1038/s41598-017-07451-x](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07451-x).

Runfeng, L.; Yunlong, H.; Jicheng, H.; Weiqi, P.; Qinhai, M.; Yongxia, S.; Chufang, L.; Jin, Z.; Zhenhua, J.; Haiming, J.; Kui, Z.; Shuxiang, H.; Jun, D.; Xiaobo, L.; Xiaotao, H.; Lin, W.; Nanshan, Z.; Zifeng, Y. Lianhuaqingwen exerts anti-viral and anti-inflammatory activity against novel coronavirus (SARS-CoV-2), **Pharmacological Research**, *in press*, 2020. DOI: [10.1016/j.phrs.2020.104761](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104761).

Sanders, J.M.; Monogue, M.L.; Jodlowski, T.Z.; Cutrell, J.B. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) A Review. **JAMA**, *in press*, 2020. DOI: [10.1001/jama.2020.6019](https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019).

Santos, K.B.; Guedes, I.A.; Karl, A.L.M.; Dardenne, L. Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-peptide Dataset. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, p. 667-683, 2020. DOI: [10.1021/acs.jcim.9b00905](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00905).

Sims, A.C.; Burkett, S.E.; Yount, B.; Pickles, R.J. SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium. **Virus Research**, 133, p. 33-44, 2008. DOI: [10.1016/j.virusres.2007.03.013](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.013).

Stebbing, J.; Phelan, A.; Griffin, I.; Tucker, C.; Oechsle, O.; Smith, D.; Richardson, P. COVID-19: combining antiviral and anti-inflammatory treatments. **The Lancet Infectious Diseases**, 20, p. 400-4002, 2020. DOI: [10.1016/S1473-3099\(20\)30132-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30132-8).

Wu, C.; Liu, Y.; Yang, Y.; Zhang, P.; Zhong, W.; Wang, Y.; Wang, Q.; Xu, Y.; Li, M.; Li, X.; Zheng, M.; Chen, L.; Li, H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, *in press*, 2020. DOI: [10.1016/j.apsb.2020.02.008](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008).

Zhou, Y.; Fu, B.; Zheng, X.; Wang, D.; Zhao, C.; qi, Y.; Sun, R.; Tian, Z.; Xu, X.; Wei, H. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients. **National Science Review**, *in press*, 2020. DOI: [10.1093/nsr/nwaa041](https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa041).