

## **Identificação**

Nome: Marcos Brown Gonçalves

Função: Professor de Magistério Superior

Departamento: Departamento Acadêmico de Física

Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Endereço: Av. Sete de Setembro, 3165 - Rebouças CEP 80230-901 - Curitiba – PR

e-mail: marcosb@utfpr.edu.br

## **Busca por alvos do SARS-CoV-2 e seleção de compostos prospectados de metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos**

### **Palavras chaves**

COVID-19, Docking Molecular, microrganismos endofíticos

### **Introdução**

O SARS-CoV-2 é um betacoronavírus da família Coronaviridae, de fita simples de RNA com envelope positivo. Nas últimas duas décadas, surgiram coronavírus humanos altamente patogênicos associados à Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) incluindo SARS-CoV em 2002, com 8.000 casos em todo o mundo (com taxa de mortalidade de aproximadamente 10%), e MERS-CoV em 2012, com 2.500 casos confirmados (com taxa de mortalidade de 36%). Comparado para MERS-CoV ou SARS-CoV, o SARS-CoV-2 tem uma taxa de mortalidade menor (em torno de 3,4 %) mas se espalha com mais eficiência, dificultando a contenção, o que levou ao surgimento da atual pandemia da COVID-19 (Doença de Coronavírus 2019), sendo a maior crise de saúde pública global nos últimos 100 anos, causando em 4 meses a morte de mais de 350.000 mortos no mundo e em torno de 26.000 no Brasil, levando ao colapso de sistemas públicos de saúde globalmente e possivelmente causando uma das maiores crises econômicas da história. Assim, a busca por novas estratégias terapêuticas para combater a infecção por SARS-CoV-2 e as patologias associadas é fundamental. Até o momento, não existe nenhum medicamento antiviral disponível clinicamente para SARS-CoV-2, ou mesmo para SARS-CoV ou MERS-CoV. Ensaios clínicos estão em andamento para o tratamento de COVID-19 utilizando o REMDESIVIR, um inibidor da enzima RNA polimerase dependente de RNA (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) que atua na multiplicação do SARS-CoV-2. Além da RdRP, várias outras proteínas vem sendo estudadas como possíveis alvos terapêuticos.

Venho trabalhando junto ao Laboratório de Bioprospecção e Genética Molecular de Microrganismos (BIOGEMM) do departamento de Genética da UFPR ([www.bio.ufpr.br/portal/biogemm](http://www.bio.ufpr.br/portal/biogemm)) coordenado pela Profa. Chirlei Glienke que há mais de 15 anos prospecta metabólitos secundários produzidos por

microrganismos endofíticos (fungos e actinobactérias) de plantas medicinais obtidas no Pantanal e Cerrado do Mato Grosso do Sul. O BIOGEMM conta com uma grande coleção de microrganismos e uma quimioteca de 38 compostos já purificados, prospectados e com atividade contra bactérias multiresistentes de interesse clínico, contra fungos fitopatogênicos e células tumorais. Destes, 5 compostos foram descritos como novos compostos, ou seja, apenas produzidos até o momento pelas linhagens endofíticas de nossa coleção, 15 compostos já foram descritos na literatura com atividade antiviral, e os 18 restantes, não foram ainda avaliados. Além desses 38 compostos já publicados, a quimioteca do BIOGEMM ainda possui outras dezenas de compostos em purificação e descrição em parceria com instituições nacionais e dos Estados Unidos, e que nunca foram avaliados quanto a sua atividade antiviral.

A presente proposta visa desenvolver duas plataformas baseadas em análises *in silico* e *in vitro*. A plataforma de análises *in silico* é baseada em docking molecular investigando as possibilidades de “encaixe físico-químico” dos 38 compostos da quimioteca e seu receptor biológico (proteínas do SARS-CoV-2 mencionadas anteriormente). Essa análise *in silico* será realizada inicialmente com os 38 compostos com estruturas já conhecidas e em uma segunda fase, com os compostos que forem sendo purificados e descritos ao longo do projeto pelos grupos do BIOGEMM-UFPR. A plataforma *in silico* será a primeira etapa do projeto, na qual os compostos promissores e os alvos virais serão selecionados para as análises *in vitro*. Na plataforma de análises *in vitro*, pelo menos duas das proteínas do SARS-CoV-2 que forem selecionadas pelas análises *in silico*, e mais uma proteína do SARS-CoV-2 que será utilizada como controle positivo, serão super-expressas em *Escherichia coli* e purificadas permitindo ensaios de afinidade com os compostos também selecionados na primeira plataforma. A super-expressão das proteínas consiste em clonar os genes (já descritos na literatura citada anteriormente) que codificam para tais proteínas do vírus SARS-CoV-2 com fusão de cauda-His em vetores de expressão, que são então introduzidos em *E. coli*. A cauda-His irá permitir a purificação das proteínas após a expressão em *E. coli*, aplicando o extrato lisado em uma coluna de afinidade HyTrap quelating nickel (GE Healthcare). A validação do sistema será realizada utilizando a proteína controle do SARS-CoV-2 super-expressa em laboratório exposta a um composto comercial que possui afinidade já descrita na literatura. Por fim, a fim de verificar a segurança dos compostos selecionados, esses serão avaliados quanto a citotoxicidade em células humanas em cultivo celular.

## Objetivo

- Desenvolver e aplicar um modelo de estudo *in silico* / *in vitro* bem como a formação de competências para o screening de compostos antivirais;
- Realizar screening *in silico* na quimioteca visando a seleção de novas drogas para combate à COVID-19;
- Capacitar professores e estudantes de Pós-Graduação em análise *in silico*.

## Metodologia

A etapa *in silico* da pesquisa será inicialmente baseada na análise com *docking* molecular investigando os potenciais sítios de ligação dos 38 compostos da quimioteca e seus receptores biológicos, que serão as proteínas do SARS-CoV-2: RdRP, Human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2), coronavirus Papain-like protease (PL pro), 3C-like protease (3CL pro), Helicase, N7 methyltransferase, Human dipeptidyl peptidase IV (DDP4), Spike receptor binding domain (RBD),

Protease cathepsin L, Type II transmembrane serine protease (TMPRSS2). A estrutura tridimensional dos compostos serão construídas e otimizados com programas de química quântica, como por exemplo o Gaussian09 (<https://gaussian.com>). O docking molecular será realizado utilizando diferentes plataformas de docking dentre elas o DockThor (<https://dockthor.incc.br/v2/>) e o Autodock (<http://autodock.scripps.edu>). A avaliação da qualidade das interações será realizada através do perfil das posições de encaixe identificadas pelo docking, da análise da energia livre de Gibbs de ligação e das interações locais entre ligante-receptor. Desta forma buscaremos investigar em primeiro lugar quais os possíveis alvos biomoleculares dos diferentes compostos; em seguida verificar as estruturas secundárias envolvidas e possíveis sítios de ligação das proteínas; analisar a relação entre os grupos funcionais dos ligantes em conjunto com os aminoácidos das regiões de ancoramento na biomolécula; e por fim relacionar os resultados do docking com a resposta biológica apresentada nos ensaios in vitro. Desta forma, o docking molecular será uma ferramenta de suporte com o objetivo de compreender em nível molecular a relação estrutural receptor-ligante com os dados de atividade antiviral.

## Perspectivas

Este projeto foi recém aprovado dentro do Edital PROIND 2020 – UFPR NO COMBATE À COVID – 19 (<http://www.proplan.ufpr.br/portal/inscricoes/>). Desta forma, como primeira etapa será realizada utilizando os 38 compostos com estruturas já conhecidas e em uma segunda fase, com os compostos que forem sendo purificados e descritos ao longo do projeto. Essa etapa paralela consiste na produção, purificação e identificação dos compostos obtidos de microrganismos endofíticos do Laboratório BIOGEMM da UFPR, e será realizada seguindo metodologias já bem estabelecidas pelo grupo da UFPR. Após a etapa do docking molecular, os compostos mais promissores serão analisados através da dinâmica molecular clássica com o objetivo de averiguar o perfil de interação do composto em seu receptor, sua estabilidade estrutural no sítio e os modos normais de vibração da proteína.

Por fim, conforme resultados experimentais já publicados pelo grupo da UFPR, os 38 compostos alvo deste estudo também apresentam atividade antibacteriana ([www.bio.ufpr.br/portal/biogemm](http://www.bio.ufpr.br/portal/biogemm)). Futuramente realizaremos docking molecular de tais compostos nas proteínas do citoesqueleto bacteriano FtsZ e MreB, já identificadas como alvos de fármacos com ação antibacterianos. Este projeto foi submetido para análise no âmbito do Edital FAPESP- Fundação Araucária 2020 ([www.fapesp.br/14051](http://www.fapesp.br/14051)).

## Assinatura

Curitiba, 20 de junho de 2020

  
Prof. Marcos Brown Gonçalves, Dr.