TELLIMAGRANDIN II: UM POTENCIAL INIBIDOR NATURAL DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-CoV-2

Gabriela Specian Pinheiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Flávio Augusto Vicente Seixas (Orientador). E-mail: favseixas@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Umuarama, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Farmacologia Bioquímica e Molecular

Palavras-chave: Docking molecular; interação proteína-ligante; bioinformática.

RESUMO

O SARS-CoV-2, agente etiológico da covid-19, apresenta elevada capacidade de transmissão e adaptação, sendo a proteína *spike* um dos principais determinantes do processo infeccioso, por mediar a ligação do vírus ao receptor ACE2 das células hospedeiras. Dessa forma, a identificação de compostos capazes de interagir com essa proteína representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de agentes antivirais. O presente trabalho teve como objetivo analisar, por meio de métodos computacionais, a interação da Tellimagrandin II, um polifenol natural, com a proteína *spike* do SARS-CoV-2. Para isso, foi utilizada a estrutura tridimensional da proteína em sua forma biológica, considerando suas cadeias polipeptídicas e glicosilações, sendo realizada simulação de *docking* molecular cego. As análises permitiram identificar diferentes cavidades potenciais de ligação, avaliadas com base na frequência de ocupação e nos escores de energia. Os resultados demonstraram que a cavidade A apresentou maior afinidade e estabilidade de interação com a Tellimagrandin II, destacando-se como o sítio de ligação mais provável. As interações observadas envolveram principalmente ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas com resíduos específicos da proteína. Assim, os achados sugerem que a Tellimagrandin II possui potencial para interferir na interação entre a proteína *spike* e o receptor ACE2.

INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 (do inglês Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2), agente etiológico da COVID-19 (do inglês COronaVIrus Disease 2019), pertence à família dos Coronavírus, que são um grupo de vírus envelopados que possuem RNA linear de fita simples sentido positivo. O SARS-CoV-2 apresenta quatro proteínas estruturais principais: a glicoproteína de superfície (do inglês Spike) (S), a proteína do envelope (E), a proteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (WANG *et al.*, 2020). As mutações na proteína S apresentadas pelo SARS-CoV-2 são as mais relevantes do ponto de vista clínico-epidemiológico, considerando seu importante papel no processo infeccioso (FREITAS; GIOVANETTI; ALCANTARA,

2021). A proteína S é uma grande glicoproteína transmembrana presente na superfície externa dos coronavírus. A proteína é clivada por proteólise formando as subunidades S1, responsável pela adsorção do vírus à superfície da célula, e S2, que promove a fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática da célula (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2021). A proteína *spike* do vírus é fundamental para o reconhecimento e ligação ao receptor ACE2 das células hospedeiras, desempenhando papel essencial no processo de infecção. Dessa forma, compostos naturais capazes de interagir de maneira estável com a proteína *spike* podem representar candidatos promissores para o desenvolvimento de estratégias antivirais. Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou que extratos de plantas contendo o composto Tellimagrandin II conseguiam inibir a infecção do SARS-CoV-2 em culturas de células Vero, onde os mecanismos mais prováveis seriam a inibição da protease principal M^{pro} e/ou a ligação com a proteína *spike* (PATTARO Jr *et al.*, 2022; ARAUJO *et al.*, 2023). Neste último mecanismo, apesar do evidente efeito antiviral, ainda não está claro como a Tellimagradin II interage com a proteína.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar por meio de simulações de *docking*, os sítios mais prováveis de ligação da Tellimagradin II à proteína *spike* de SARS-CoV-2, bem como seu modo de interação com a proteína.

MATERIAIS E MÉTODOS

A estrutura biológica da proteína *spike* do SARS-CoV-2, composta por três cadeias polipeptídicas glicosiladas (BUCHANAN *et al.*, 2022) foi obtida da base de dados Protein Data Bank (PDBid: 7qus) e utilizada para as simulações de *docking* cego. A região apical da proteína, que corresponde à interface de ligação com o receptor ACE2, foi definida como área de busca. O ligante Tellimagrandin II (CID 151590) foi submetido a *docking* cego, por meio do programa Autodock Vina, centrado 166, 161 e 220, e caixa de busca com dimensões de 170, 147 e 45 nos eixos *x*, *y* e *z*, respectivamente. As cavidades da proteína que podem ser os prováveis sítios de ligação foram identificadas por meio do programa Molegro Virtual Docker v-6.0. Foram realizadas 50 simulações de *docking* cego e os locais de ancoragem das poses na proteína foram comparados com as cavidades encontradas. Os escores de energia, a frequência de ocupação e a reprodutividade das poses foram utilizados para identificar os sítios de maior afinidade. A média e o desvio padrão foram calculados com o programa Origin-6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estrutura da unidade biológica da proteína *spike* do vírus SARS-Cov-2 é formada por três cadeias polipeptídicas glicosiladas (Figura 1). Parte da estrutura com as três cadeias, incluindo as glicosilações, foi utilizada na simulação de *docking*, onde a janela de busca foi definida na região apical, que também é a superfície mais externa da proteína, a qual faz contato com o receptor ACE2 da célula do hospedeiro.

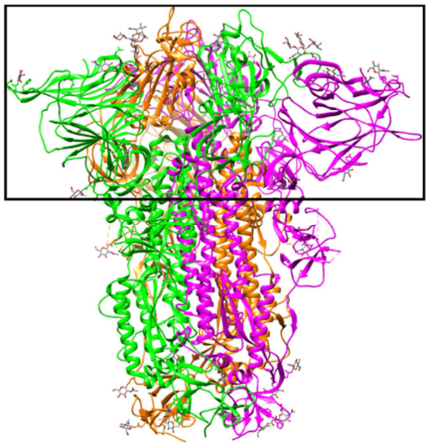


Figura 1. Modelo em fita da estrutura da proteína *spike* de SARS-CoV-2 formada por três cadeias que são mostradas em cores diferentes. As glicosilações da proteína são mostradas no formato de bastões e, a região da proteína utilizada no *docking* cego é mostrada na caixa em preto.

A Figura 2a mostra a estrutura da proteína *spike* do vírus SARS-Cov-2 destacando que oito cavidades nomeadas de A a H (Figura 2b) foram visitadas pelo ligante Tellimagradin II.

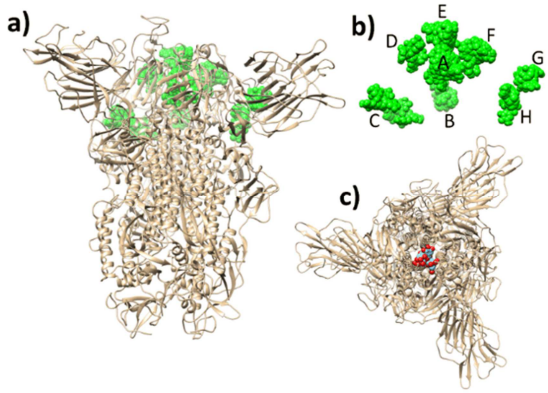


Figura 2. a) Modelo em fita da estrutura da unidade biológica da proteína *spike* de Sars-CoV-2 (bege), mostrando a localização das cavidades (verde) que foram visitadas pelo ligante Tellimagrandin II durante a simulação de *docking* cego. **b)** Detalhe com a identificação das oito cavidades (nomeadas de A a H) mostradas em a). **c)** Visão da superfície externa da proteína *spike* mostrando a pose do ligante Tellimagradin II com maior escore na simulação de *docking*, inserida na cavidade A.

A análise estatística dos resultados mostrou que a cavidade A foi a mais visitada pelo ligante em 18 das 50 tentativas de *docking* e também foi a cavidade que apresentou poses de maior escore (Tabela 1). Esta cavidade também é a de maior volume em toda a estrutura e está localizada bem na região central formada pela trinca das subunidades que compõem a proteína *spike*. A segunda cavidade mais visitada foi a E, que fica bem próxima à cavidade A.

Tabela 1. Análise estatística das cavidades visitadas pelo ligante durante o *docking* cego.

Cavidades	A		B		C		D	
	n	**Score (sd)**	**n**	**Score (sd)**	**n**	**Score (sd)**	**n**	**Score (sd)**
	18	-9,61 ± 0,28	4	-8,28 ± 0,65	3	-8,90 ±0,00	4	-8,88 ±0,49
	E		**F**		**G**		**H**	
	n	**Score (sd)**	**n**	**Score (sd)**	**n**	**Score (sd)**	**n**	**Score (sd)**
	12	-8,62 ± 0,13	1	-8,90 ± 0,00	4	-8,70 ± 0,10	4	-8,57 ± 0,05

Assim, a cavidade A destacou-se como o local de maior afinidade, o que sugere que esta cavidade representa o sítio de ligação mais provável e funcional, onde o ligante se acomoda de forma estável e específica.

O diagrama bidimensional (Figura 3) detalha as interações específicas que a pose de maior escore do ligante fez com resíduos da cavidade A da proteína. Entre os principais contatos, destacam-se as duas interações do tipo carga-dipolo entre a cadeia lateral do resíduo Asp2543, que se conecta às hidroxilas do ligante. A cadeia lateral do resíduo Tyr2646 participa de uma ponte de hidrogênio (interação dipolo-dipolo) com o ligante. Adicionalmente, grupos da cadeia principal dos resíduos de Gly404, Arg408, Val2545 e Ile2548, também fazem ponte de hidrogênio (interação dipolo-dipolo) com o ligante. Ao todo, observamos oito interações de natureza eletrostática entre a proteína e o ligante.

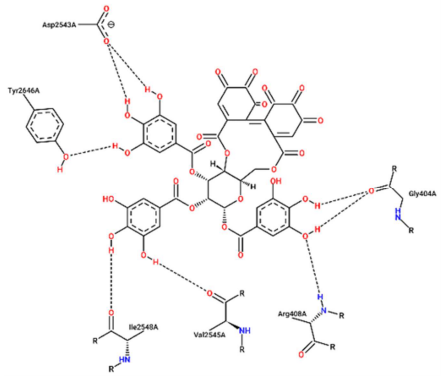


Figura 3. Interações que o ligante Tellimagrandin II faz com os resíduos de aminoácidos na cavidade A da proteína *spike*, que é mostrada na figura 1c.

O resultado indica que a cavidade A pode representar um sítio de ligação funcional da Tellimagrandin II, corroborando a hipótese de que compostos fenólicos possam atuar como inibidores da interação entre a proteína viral e o receptor ACE2 e prevenindo assim a entrada do vírus na célula, o que justifica os resultados obtidos nos ensaios de infecção *in vitro* já realizados (PATTARO Jr *et al.*, 2022; ARAUJO *et al.*, 2023). Desta forma, apesar de ter sido demonstrado que a Tellimagrandin II pode inibir a Mpro, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a Tellimagrandin II também pode inibir a infecção viral ao se colocar entre o contato da

proteína spike e o receptor ACE2, o que indica um mecanismo de ação sinérgico na inibição da infecção viral.

CONCLUSÕES

As simulações de docking demonstraram que a Tellimagrandin II interage com alta afinidade e estabilidade com a proteína spike do SARS-CoV-2. A cavidade A destacou-se como o sítio de ligação mais provável e funcional, apresentando a maior frequência de ocupação, os melhores escores de energia e oito interações eletrostáticas com resíduos-chave. Os resultados indicam que o composto pode bloquear a interface de contato com o receptor ACE2 e atuar de forma sinérgica com a inibição da protease M^{pro}, consolidando-se como candidato promissor para futuros testes *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao PIBIC – CNPq/FA/UEM pelo apoio financeiro e incentivo à iniciação científica, fundamentais para a realização deste trabalho. À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela infraestrutura e pelo suporte acadêmico.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, I. G. et al. *Potential of plant extracts in targeting SARS-CoV-2 main protease: an in vitro and in silico study*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 21, p. 12204–12213, 2023. DOI: 10.1080/07391102.2023.2166589.

BUCHANAN, C. J. et al. *Pathogen-sugar interactions revealed by universal saturation transfer analysis*. **Science**, v. 377, n. 6604, p. eabm3125, 2022. DOI: 10.1126/science.abm3125.

DEJNIRATTISAI, W. et al. *Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2*. **Cell**, v. 184, n. 11, p. 2939–2954, 2021.

FREITAS, R. R. A.; GIOVANETTI, M.; ALCANTARA, L. C. J. *Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde coletiva*. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 4, p. 1–10, 2021. DOI: 10.31005/iajmh.v4i.181

PATTARO-JUNIOR, J. R. et al. *Antiviral activity of Cenostigma pluviosum var. peltophoroides extract and fractions against SARS-CoV-2*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 15, p. 7297-7308, 2023. DOI: 10.1080/07391102.2022.2120078.

WANG, H. et al. *The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 9, p. 1629–1635, 2020. DOI: 10.1007/s10096-020-03899-4.