



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ARTHUR VAN LAUTER ALBUQUERQUE PEREIRA

**ANÁLISE *IN SILICO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE DERIVADOS
TIAZOLIDÍNICOS NA VIROPORINA DO SARS-CoV-2**

RECIFE

2023

ARTHUR VAN LAUTER ALBUQUERQUE PEREIRA

**ANÁLISE *IN SILICO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE DERIVADOS
TIAZOLIDÍNICOS NA VIROPORINA E DO SARS-CoV-2**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Farmacêuticas Bacharelado da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dijanah Cota Machado

Coorientador: Prof. Dr. Jeann Fabiann Branco Júnior

RECIFE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Albuquerque Pereira, Arthur van Lauter.

Análise in silico da atividade antiviral de derivados tiazolidínicos na viroporina E do SARS-CoV-2 / Arthur van Lauter Albuquerque Pereira. - Recife, 2023.

40 : il., tab.

Orientador(a): Dijanah Cota Machado

Coorientador(a): Jeann Fabiann Branco júnior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

1. COVID-19. 2. Viroporina . 3. Compostos tiazolidínicos. 4. Atividade antiviral. I. Cota Machado, Dijanah. (Orientação). II. Branco júnior, Jeann Fabiann. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 27/09/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br DIJANAH COTA MACHADO
Data: 03/10/2023 15:32:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Dijanah Cota Machado
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELLE PATRÍCIA CERQUEIRA MACEDO
Data: 03/10/2023 20:17:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo
(Presidente e Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE ARION DA SILVA MOURA
Data: 03/10/2023 14:36:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. José Arion da Silva Moura
(Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Artur Alves Rodrigues da Silva
(Suplente)
Universidade Federal de Campina Grande

Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha mãe Laura e a avó Iolanda por sempre me auxiliarem ao longo de toda essa trajetória que, mesmo distantes, sempre estiveram presentes com seu amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a Deus por todas as bênçãos ao longo do curso, e também a todos os meus familiares mais próximos em especial a minha mãe Laura e a minha avó Iolanda por sempre acreditarem no meu potencial, nunca medindo esforços para me dar suporte em todos os momentos difíceis que ocorreram ao longo de toda a graduação.

Queria agradecer ao Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco – Dr. Oleg Krasilnikov, por ter me recebido logo após a pandemia, me dando uma segunda chance na vida acadêmica e uma segunda casa onde tive a oportunidade de conhecer amigos que espero levar para a vida. Em especial, quero agradecer à professora Dijanah Cota Machado por me orientar nesse trabalho, sendo sempre solícita e paciente comigo, me ensinando lições que vou levar para a vida com bom humor e um coração gigante.

Também quero agradecer ao meu coorientador, Jeann Fabiann Branco Júnior, por toda a paciência e disponibilidade de revisar meu trabalho desde seu projeto, nunca perdendo o critério elevado e a elegância. Obrigado por se tornar um amigo ao longo de todos esses anos de luta.

Por fim, quero agradecer a todos os amigos que consegui ao longo dessa jornada dentro e fora do Curso de Bacharelado em Ciências Farmacêuticas e estiveram comigo em cada prova, trabalho, resumo compartilhado, estágio realizado e tantos outros momentos que ultrapassam os muros da universidade.

Foi um percurso difícil, cheio de idas e vindas, término e recomeços, mas no fim das contas percebo que valeu a pena cada momento vivido com todas as pessoas que cruzaram meu caminho de alguma forma.

RESUMO

A pandemia causada pela COVID-19 se tornou um problema emergente ao longo dos últimos anos, resultando na morte de milhares de pessoas ao redor do mundo. O vírus responsável por este quadro é o SARS-CoV-2, que possui uma estrutura simples, formada por proteínas constituintes que possuem funções diversas na habilidade que o vírus tem para se estabelecer e se fixar na célula hospedeira. Dentre as proteínas estruturais, a proteína E do envelope recebe destaque pela capacidade que possui de se auto-organizar em um canal, chamado viroporina, de estrutura pentamérica transmembranar que perturba o equilíbrio hidroeletrólítico da célula hospedeira e auxilia na lise da membrana para facilitar a liberação dos vírions. Como forma de tentar utilizar este mecanismo do vírus para atenuar ou inibir a ação deste canal, diversos estudos *in silico* foram realizados para elencar possíveis fármacos com ação antiviral, comprovada na literatura, para verificar sua respectiva efetividade. Neste sentido, o presente estudo visou realizar a análise *in silico* de compostos tiazolidínicos na viroporina com o objetivo de analisar a afinidade predita, ranqueando os ligantes com maior potencial terapêutico e avaliar as interações intermoleculares mais relevantes. Foram utilizadas as estruturas dos compostos LPFS/AG-55, LPFS/AG-58, LPSF/AG-104, LPSF/GQ-294, LPSF/GQ-310 e seus respectivos diastereoisômeros E e Z. O programa Avogadro foi empregado para converter as estruturas 2D cedidas em 3D e então submetê-las à minimização de energia utilizando o campo de força MMFF94s. A estrutura da viroporina foi obtida no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB), sob o código ID PDB: 7K3G. O processamento das simulações de docking molecular foi realizado com a plataforma DockThor versão 2.0. Dentre os 12 compostos avaliados, o que obteve o melhor desempenho foi o GQ-294 (Z), com valor de afinidade de -7,959 kcal/mol e de energia total de -11,617 kcal/mol. Contudo, estudos posteriores são necessários para comprovar a efetividade apontada nas análises computacionais realizadas, visando a viabilização na prospecção de novas alternativas terapêuticas no tratamento da COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19. Viroporina. Compostos tiazolidínicos. Atividade antiviral.

ABSTRACT

The pandemic caused by COVID-19 has become an emerging problem over the past few years resulting in thousands deaths of people around the world. The virus responsible for this condition is SARS-CoV-2, which has a simple structure, formed by constituent proteins that have different functions in the virus's ability to establish itself and fix itself in the host cell. Among the structural proteins, the envelope protein E stands out due to its ability to self-organize into a channel, called viroporin, with a pentameric transmembrane structure that disturbs the hydroelectrolyte balance of the host cell and assists in membrane lysis to facilitate release. of virions. As a way of trying to use this mechanism of the virus to attenuate or inhibit the action of this channel, several in silico studies were carried out to list possible drugs with antiviral action, proven in the literature, to verify their respective effectiveness. In this sense, the present study aimed to carry out the in silico analysis of thiazolidine compounds in the viroporin with the aim of analyzing the predicted affinity, ranking the ligands with the greatest therapeutic potential and evaluating the most relevant intermolecular interactions. The structures of the compounds LPFS/AG-55, LPFS/AG-58, LPSF/AG-104, LPSF/GQ-294, LPSF/GQ-310 and their respective diastereoisomers E and Z were used. The Avogadro program was used to convert the 2D structures ceded into 3D and then subject them to energy minimization using the MMFF94s force field. The viroporin structure was obtained from the Protein Data Bank (PDB) database, under PDB ID code: 7K3G. The processing of molecular docking simulations was carried out using the DockThor platform version 2.0. Among the 12 compounds evaluated, the one that performed best was GQ-294 (Z), with an affinity value of -7.959 kcal/mol and total energy of -11.617 kcal/mol. However, further studies are necessary to prove the effectiveness indicated in the computational analyzes carried out, aiming to facilitate the prospecting of new therapeutic alternatives in the treatment of COVID-19.

Keywords: COVID-19. Viroporin. Thiazolidine compounds. Antiviral activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura viral do SARS-CoV-2.....	14
Figura 2. Representação esquemática da proteína E.....	16
Figura 3. Representação esquemática dos derivados tiazolidínicos.....	17
Figura 4. Compostos tiazolidínicos destinados à análise.....	22
Figura 5. Interações ligante-receptor dos diastereoisômeros (Z) da série LPSF/AG baseado nos resultados da plataforma DockThor no sítio de ligação da viroporina.....	25
Figura 6. Interações ligante-receptor dos diastereoisômeros (E) da série LPSF/AG baseado nos resultados da plataforma DockThor no sítio de ligação da viroporina.....	27
Figura 7. Interações ligante-receptor dos diastereoisômeros (Z) da série LPSF/GQ baseado nos resultados da plataforma DockThor no sítio de ligação da viroporina..	29
Figura 8. Interações ligante-receptor dos diastereoisômeros (E) da série LPSF/GQ baseado nos resultados da plataforma DockThor no sítio de ligação da viroporina..	31
Figura 9. Ranqueamento geral dos compostos analisados.....	33
Tabela 1. Média das coordenadas utilizadas para o posicionamento da caixa para docagem na proteína 7K3G (viroporina).....	23
Tabela 2. Resultados da energia de afinidade e total obtidos do docking dos diastereoisômeros Z da série LPSF/AG com a viroporina no DockThor.....	24
Tabela 3. Resultados da energia de afinidade e total obtidos do docking dos diastereoisômeros E da série LPSF/AG com a viroporina no DockThor.....	26
Tabela 4. Resultados da energia de afinidade e total obtidos do docking dos diastereoisômeros Z da série LPSF/GQ com a viroporina no DockThor.....	28
Tabela 5. Resultados da energia de afinidade e total obtidos do docking dos diastereoisômeros E da série LPSF/GQ com a viroporina no DockThor.....	30

LISTA DE SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Severa
ORFs	Open Reading Frames
ECA II	Enzima Conversora da Angiotensina II
IBV	Infectious Bronchitis Virus
MHV	Mouse Hepatitis Virus
NUPIT-SG	Núcleo de Inovação Terapêutica Suely Galdino
MMFF94s	Merk Molecular Force Field 94 s
PDB	Protein Data Bank
LBM-CT	Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco
DB	Departamento de Biofísica
T	Temperatura absoluta
R	Constante do gás
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação de entropia
K_i	Constante de ligação experimental
\ln	Logaritmo neperiano
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DO COVID-19.....	13
2.2 ESTRUTURA VIRAL DO SARS-CoV-2 E INIBIDORES POTENCIAIS DA PROTEÍNA E.....	14
2.3 RELAÇÃO DE INIBIÇÃO DA PROTEÍNA E DO SARS-CoV-2.....	16
2.3.1 Derivados Tiazolidínicos.....	17
2.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> NA PROSPECÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS.....	18
2.4.1 DockThor.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS LIGANTES.....	22
4.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA.....	22
4.3 ANCORAGEM E APLICAÇÃO DA FUNÇÃO SCORE.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 RESULTADOS DO DOCKTHOR PARA A SÉRIE LPSF/AG.....	24
5.1.1 Série LPSF/AG (Z).....	24
5.1.2 Série LPSF/AG (E).....	26
5.2 RESULTADOS DO DOCKTHOR PARA A SÉRIE LPSF/GQ.....	28
5.2.1 Série LPSF/GQ (Z).....	28
5.2.2 Série LPSF/GQ (E).....	30
5.3 ANÁLISE COMPARATIVA.....	32
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, que tem se mostrado um problema de saúde pública recorrente nos últimos anos. Esta patologia apresenta como principais sintomas febre, cansaço e tosse seca, com a possibilidade de apresentar variação de sintomas entre os pacientes afetados como hipogeusia ou anosfrasia, congestão nasal, odinofagia, cefaleia, artralgia, mialgia, diferentes tipos de erupção cutânea, náusea ou êmese, diarreia, calafrios ou tonturas (OPAS, 2023).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), esta doença já causou mais de 6,9 milhões de óbitos registrados, se disseminando ao redor do mundo, o que conferiu a esta o quadro de pandemia (OMS, 2023). Por essa razão, uma série de estudos foram realizados para delimitar o agente etiológico e desenvolver novas formas de prevenção e combate ao vírus, com a delimitação dos sítios-alvo e prospecção de novos fármacos.

O vírus SARS-CoV-2, agente causador da síndrome respiratória aguda grave característica da doença, é formado por uma série de proteínas que desempenham diversas funções. A proteína *spike* (S) é responsável por mediar o processo de entrada do vírion na célula hospedeira e, junto com a proteína de membrana (M) e proteína do envelope (E), compõem a partícula viral. Na porção interior há a presença da proteína do nucleocapsídeo (N) responsável por proteger o genoma viral, e algumas proteínas não estruturais da célula (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020). Uma vez inoculado na célula, a proteína E entra em atividade, formando uma viroporina transmembrana, estrutura responsável pela perturbação no controle hidroeletrolítico que tende a facilitar a lise celular para a liberação dos novos vírions formados, causando danos no organismo do hospedeiro (Cao *et al.*, 2021).

Tendo em vista o risco em potencial causado pela atividade dessa viroporina formada pela proteína E, uma série de estudos podem ser encontrados na literatura, tentando elencar compostos que possuem atividade antiviral para realizar o processo de inibição do canal (Ewart *et al.*, 2002; Wilson, Gage, Ewart, 2006). Dentre os candidatos viáveis estão os compostos tiazolidínicos, estruturas compostas por um anel pentamérico carbonilado que exhibe um átomo de enxofre na posição 1 e um de nitrogênio na posição 3, as quais apresentam atividade antiviral comprovada na literatura contra a viroporina da proteína E do vírus HIV, influenza A e hepatite C (Tripathi *et al.*, 2014).

Para avaliar a possível atividade destes candidatos na inibição do SARS-CoV-2, a utilização de análises *in silico* são a opção de primeira escolha para determinar a atividade e interações intermoleculares. Plataformas, como o DockThor, são utilizadas para prospectar a interação entre o candidato a fármaco ligante e o canal viral receptor, para delimitar possíveis interações e efetividade terapêutica antes da pesquisa *in vitro* ou *in vivo* serem realizadas (Magalhães *et al.*, 2014).

Outro fator determinante para o êxito no bloqueio da viroporina é a utilização de moléculas pequenas. De acordo com a literatura, o uso de moléculas menores na função de inibidores destes tipos de canais virais tem sido efetivo para diferentes tipos de vírus, a exemplo do uso clássico da amantadina como inibidor do canal de prótons M2 do vírus influenza A (Oxford; Galbraith, 1980) e dos derivados de amilorida, que atestam bloqueio na atividade do canal iônico da proteína E do Vpu do HIV-1 (Ewart *et al.*, 2002) e do coronavírus (Wilson; Gage; Ewart, 2006).

Levando em consideração a relevância do quadro pandêmico vivenciado ao longo dos últimos anos, a pesquisa de novas moléculas com ação direta na atenuação e inibição do SARS-CoV-2 se faz necessário. É importante mapear novas formas de combate ao vírus já estabelecido no organismo, para favorecer a capacidade de melhora do paciente em caso de infecção. Por essa razão que o estudo mais aprofundado da estrutura viral é indispensável na prospecção de novos alvos. Empregando novas formas de combate, a chance de sucesso no tratamento monoterápico ou até mesmo através da combinação de fármacos que atuem em diferentes alvos do mesmo agente etiológico viral podem promover a diminuição dos riscos à saúde da população de forma mais efetiva.

Tendo em vista a pesquisa de novos alvos, a proteína E tem se mostrado um bom sítio ativo para a atenuação do quadro viral e manutenção da sobrevivência celular. Análises *in silico* combinadas aos estudos já presentes na literatura atestam a viabilidade de ação neste novo alvo, evidenciando a possibilidade de inibição do vírus mediante bloqueio do canal formado pela proteína. Desse modo, a pesquisa de novos ligantes com potencial ação neste alvo são de extrema importância para o desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos a longo prazo.

Por essa razão, o presente estudo visou analisar o potencial antiviral dos compostos tiazolidínicos e rodanínicos pertencentes, respectivamente, às séries LSPF/GQ e LPSF/AG por meio da inibição da viroporina do SARS-CoV-2, com a intenção de prospectar a possível utilização terapêutica destes compostos. Os compostos das séries LPSF/AG e LPSF/GQ são potenciais alvos por conta do tamanho estrutural reduzido, uma vez que a ação de

moléculas muito grandes seria dificultada na área de torção do canal, principal região de interesse para o bloqueio da vioporina E (To; Surya; Torres, 2016).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DO COVID-19

A COVID-19 tem se mostrado um desafio para saúde pública nos últimos anos. Inicialmente categorizado como uma pneumonia indeterminada, o primeiro foco registrado foi recorrente em adultos que frequentavam o mercado de frutos do mar Huanan, na cidade de Wuhan, localizada na região Hubei da China, se apresentando como uma doença cujo mecanismo ocasionava um processo de síndrome respiratória aguda severa (SARS) (Huang *et al.*, 2020). Após análise mais acurada por métodos de biologia molecular, foi constatada 70% de homologia do agente etiológico desta nova doença com o vírus SARS-CoV, com mais de 95% de similaridades com o coronavírus de morcego. Do início dos relatos dos casos em dezembro de 2019 até meados de 2020 houve um aumento exponencial do número de casos de transmissão humano-humano até o registro do primeiro óbito no dia 11 de janeiro de 2020 (Siddiqui; Alhamdi; Alghamdi, 2022).

Um agente facilitador da proliferação da doença foi o grande fluxo populacional na cidade de Wuhan, devido ao festival da primavera da região que estava ocorrendo durante o período de início dos casos. Mesmo com os esforços do governo chinês para regular o movimento populacional, o vírus se espalhou pelas demais cidades próximas e posteriormente outros países através de portadores assintomáticos da doença. A progressão deste contágio ao longo dos meses resultou no estabelecimento da doença transmitida pelo coronavírus como uma pandemia pela OMS em 11 de março de 2020 (Li *et al.*, 2020).

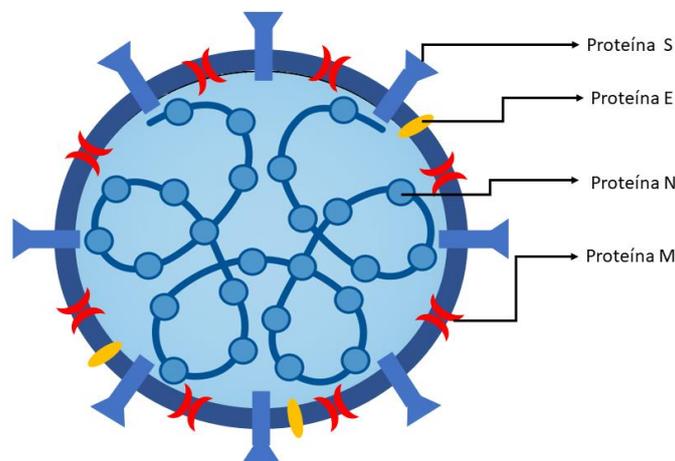
Como resultado da pandemia estabelecida por causa da fácil transmissibilidade da doença, o quantitativo de casos ao redor do mundo aumentou progressivamente. De acordo com estimativas realizadas pela OMS, o número total de casos registrados associados diretamente à pandemia de COVID-19 entre o período datado de 1 de janeiro de 2020 até o dia 30 de agosto de 2023 foi de aproximadamente 770 milhões de pessoas, das quais cerca de 6,9 milhões resultaram em óbito. No Brasil, durante o mesmo período de tempo apresentado, cerca de 37,7 milhões de casos foram registrados, dos quais foram relatados 704 mil óbitos (OMS, 2023). Por esta razão, é importante ressaltar a relevância de pesquisas acerca da doença e do seu agente etiológico para o desenvolvimento de novas formas de prevenção e combate.

2.2 ESTRUTURA VIRAL DO SARS-CoV-2 E INIBIDORES POTENCIAIS DA PROTEÍNA E

O coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda-grave (SARS-CoV-2), responsável por causar o COVID-19, pertence à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, do gênero *Betacoronavirus*. Estruturalmente, o vírus é composto por um filamento de RNA simples positivo, que pode ser traduzido de modo similar ao RNA mensageiro facilitando sua leitura, envolto por um capsídeo helicoidal que forma um arranjo espiral flexível de aspecto polimórfico e um envelope lipoproteico originário da célula hospedeira previamente infectada (Palú, 2021).

Na partícula estão presentes as proteínas vírus-específicas codificadas pelo genoma, que irão facilitar a inoculação viral nas células, bem como a manutenção deste no organismo. Os vírus do gênero *Betacoronavirus* possuem regiões abertas de codificação (ORFs), que serão transcritas e traduzidas em proteínas menores ou peptídeos com importância no ciclo de infecção viral. São proteínas constituintes da estrutura do SARS-CoV-2: a proteína estrutural *Spike* (S), a proteína de membrana (M), a proteína do nucleocapsídeo (N), e a proteína do envelope (E) como podem ser observadas na Figura 1. Além destas, há proteínas não estruturais como a hemaglutinina esterase (HE), helicase (H), proteases semelhantes à papaína (PLP ou PLpro), proteases semelhantes a 3C (3CLpro) e proteínas replicase (Wong; Sier, 2021).

Figura 1. Estrutura viral do SARS-CoV-2.



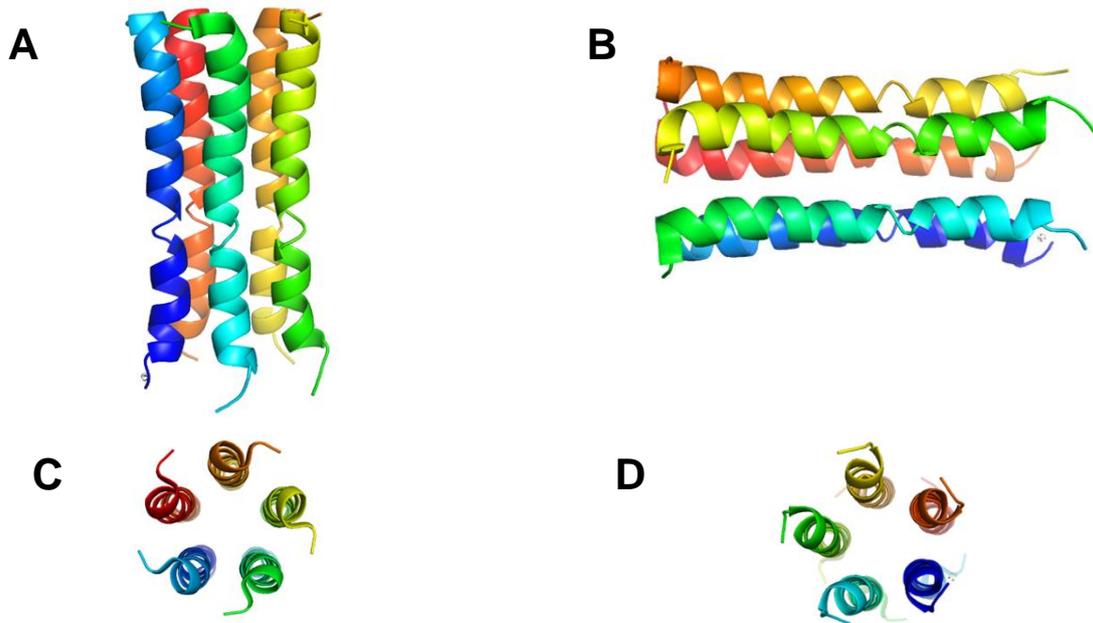
Fonte: adaptado de Jackson *et al.* (2021).

A proteína *Spike* (S) é um homodímero fixado na membrana do vírion e tem por objetivo favorecer a entrada pela fusão das membranas. É composto por duas subunidades: S1, responsável pela ligação com a enzima conversora da angiotensina II (ECA II), e S2, responsável pelo ancoramento da proteína S na membrana viral mediante auxílio da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) presente nos tecidos do organismo infectado, que induz a fusão de membranas vírus-hospedeiro na superfície celular. No entanto, se a célula hospedeira não expressar TMPRSS2 na membrana ou não haja a interação do vírus com essa protease, o processo de entrada ocorre através de endocitose mediada por clatrina do complexo ECA II-vírus na célula hospedeira na forma de endolisossomos (Jackson *et al.*, 2021; Matsuyama *et al.*, 2010).

No caso da proteína M, esta é considerada o constituinte mais abundante da estrutura do SARS-CoV-2, compondo o envelope viral junto com as proteínas E e S, e apresentando importante papel na patogenia da doença por interferir na resposta inflamatória do hospedeiro (Kadam *et al.*, 2021). Já a proteína N é responsável por armazenar e ligar os fragmentos de RNA presentes no vírion (Bai *et al.*, 2021).

A proteína E (Figura 2) é a menor das proteínas estruturais presentes no envelope viral. Atua na modulação da resposta integrada ao estresse do hospedeiro, suprimindo a ativação do inflamossoma NLRP3 e aumentando a virulência viral (Yalcinkaya *et al.*, 2021). Essa proteína viral é capaz de alterar a permeabilidade da membrana como forma de facilitar a liberação dos vírions presentes nas células infectadas através da formação de viroporinas, proteínas de membrana integrais com um tamanho de aproximadamente 50-120 aminoácidos com pelo menos uma porção hidrofóbica, formando uma α -hélice anfipática (Madan *et al.*, 2005). No caso desta viroporina, sua estrutura é formada por 5 oligômeros da proteína E, a qual é capaz de regular o microambiente celular através dos poros pentaméricos hidrofílicos formados. Esses canais permitem a passagem de água e íons pela membrana celular, levando a um quadro de colapso dos potenciais de membrana e gradientes iônicos, lisando a célula e facilitando a disseminação viral (Cao *et al.*, 2021).

Figura 2. Representação esquemática da proteína E (ID PDB: 7K3G). (A) disposição vertical; (B) disposição lateral; (C) disposição superior; (D) disposição inferior.



Fonte: autoria própria (2023).

2.3 RELAÇÃO DE INIBIÇÃO DA PROTEÍNA E DO SARS-CoV-2

O processo de formação da viroporina pela proteína E, ainda que não esteja plenamente elucidado na literatura, é descrito como um processo de auto-organização em oligômeros formando uma viroporina transmembranar pentamérica composta de cinco α -hélices através da interação dos oligômeros com GxxxG motifs (Alencar *et al.*, 2022). O GxxxG motif, também chamado de [small]xxx[small], representa uma estrutura pequena que se repete, onde a região denominada G ou [small] pode ser formada por glicina, alanina ou serina e comporta uma tríade de aminoácidos quaisquer representados por xxx. É essa organização estrutural que maximiza as interações de van der Waals e ligações de hidrogênio para favorecer a proximidade entre as hélices integrantes do canal transmembrana (Teese; Langosch, 2015). A superfície dos GxxxG motifs são, portanto, uma estrutura de suporte para a dimerização dos oligômeros da proteína E na formação das α -hélices da viroporina transmembrana (Russ; Engelman, 2000).

Um dos processos de inibição presentes na literatura têm como alvo a viroporina formada pela proteína E após a inoculação do vírus na célula hospedeira, visando a atenuação dos processos danosos causados pelo canal viral. Foram sugeridas a utilização de compostos com atividade antiviral comprovada em outros vírus como boas alternativas, a exemplo da tretinoína, metabólito intermediário da vitamina A que apresentou atividade de inibição do vírus influenza A e apresentou atividade inibitória também da viroporina do

SARS-CoV-2 através da ligação com sítios hidrofóbicos do canal (Dey; Borkotoky; Banerjee, 2020).

Outros compostos presentes na literatura são o hexametileno de amilorida e amantadina, que apresentaram boa atividade inibitória em outros vírus, como HIV, vírus da bronquite infecciosa (IBV), vírus da hepatite em ratos (MHV) (Wilson; Gage; Ewart, 2006) e o vírus influenza A, sendo eficazes na inibição da capacidade de condução da viroporina do SARS-CoV-2 (Ewart *et al.*, 2002). Ademais, compostos como rutina, flavonoide glicosídico com atividade antiviral (Savov *et al.*, 2006), e doxiciclina, antibiótico tetracíclico com atividade antimicrobiana e antiviral (Ng *et al.*, 2012), são capazes de se ligar aos resíduos da viroporina por ligações de hidrogênio e inibir a formação do canal (Bonzano *et al.*, 2020).

2.3.1 Derivados Tiazolidínicos

Há diversos compostos de interesse terapêutico derivados da tiazolidina. Dentre eles é possível destacar a tiazolidina-2,4-diona e a 2-tioxotiazolidin-4-ona (Figura 3). A tiazolidina-2,4-diona (TZD) é um análogo não aromático do grupamento tiazol com dois grupos carbonila na posição 2 e 4 do anel. Essa estrutura se apresenta como um sólido branco cristalino, ponto de fusão de 123-125 °C e é estável quando mantido abaixo de 30°C (Long; Gresley; Wren, 2021).

Já a 2-tioxotiazolidin-4-ona, também chamada de rodanina, é um bioisómero do TZD, que difere apenas em C-2, contendo um tiocarbonil em vez de carbonil em C-2 (Chaurasyia *et al.*, 2022). Assim como a tiazolidina-2,4-diona, o núcleo da rodanina oferece diversas possibilidades de substituição nas posições N-3 e C-5 do núcleo, o que possibilita uma ampla gama de reações que podem ser conduzidas na estrutura principal destas moléculas, resultando nas diversas atividades farmacológicas de interesse dos seus derivados.

Figura 3. Representação esquemática dos derivados tiazolidínicos. Tiazolidina-2,4-diona (A) e da 2-tioxotiazolidin-4-ona (B).



Fonte: autoria própria (2023).

Os derivados tiazolidínicos são reconhecidos por estimular o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), que sugere uma ação antitumoral através da indução de apoptose, autofagia, diferenciação celular e proliferação celular (Kumar; Marwaha, 2019). Além disso, interferem nas vias de sinalização celular entre tecidos sensíveis à insulina levando ao efeito hipoglicemiante característico (Hidalgo-Figueroa *et al.*, 2013). No que se refere à ação antioxidante dos derivados tiazolidínicos, comprovou-se eficácia como inibidor da xantina oxidase, tendo eficácia comprovada na manutenção de condições hiperuricêmicas (Beedkar *et al.*, 2012; Begum *et al.*, 2014). Há também atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima prostaglandina sintase (enzima COX-ciclooxigenase), apontando um efeito protetor direto nas células neuronais (Youssef *et al.*, 2010).

Os derivados tiazolidínicos, por possuírem uma estrutura simples, podem ser facilmente modificados para desempenhar diversas atividades em uma série de alvos biológicos por conterem átomos de nitrogênio (N) e enxofre (S) em sua estrutura heterocíclica, sendo efetiva na inibição do vírus influenza A, por exemplo (Liu *et al.*, 2011). Também apresentam boa eficácia na inibição viral do HIV-1 com a capacidade de inibir a transcriptase reversa (Bahare *et al.*, 2015; Kaminky, 2015) e do vírus da hepatite C (Tripathi *et al.*, 2014). No que se refere ao SARS-CoV-2, os derivados tiazolidínicos também apresentaram atividade inibindo a protease principal (Mpro), proteína não estrutural responsável por processos intrínsecos à produção de RNA subgenômico viral e das proteínas estruturais (Ye *et al.*, 2023), sendo uma classe farmacológica relevante na prospecção de novo sítios ativos contra o vírus, especialmente se considerada sua possível ação anti-inflamatória e antioxidante concomitante.

2.4 ANÁLISE *IN SILICO* NA PROSPECÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS

Os testes *in silico* têm se mostrado uma excelente alternativa para análises de compostos por serem importantes na prospecção de novos fármacos, bem como para o estudo de mecanismos de ação de fármacos já conhecidos, sendo o docking molecular uma ferramenta indispensável para compreensão das possíveis interações do ligante com seu receptor (Monteleone *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021). O docking molecular, portanto, pode ser categorizado como um processo através do qual moléculas são encaixadas em estruturas para pontuar seus valores de interação nos locais de ligação. É uma pesquisa com utilidade dinâmica em diversas áreas da inovação terapêutica através da elaboração

de modelos de drogas baseadas em estrutura, elucidação de vias bioquímicas e o design de medicamentos (Saikia; Bordoloi, 2019).

Por essa razão, uma grande gama de programas e ferramentas computacionais são amplamente utilizadas e difundidas no meio acadêmico para a realização de diversas análises tendo em vista uma maior compreensão das interações biológicas entre a proteína, ácido nucleico ou carboidrato e seus respectivos ligantes de interesse. A principal vantagem dessa linha de pesquisa computacional é a predição das diferentes propriedades de cada uma das moléculas analisadas, como afinidade e energia total, correlacionando a eficácia entre os fármacos e seus possíveis mecanismos de ação na estrutura viral, a exemplo das pesquisas relacionadas aos estudos na proteína E.

De acordo com a literatura, as interações mais comuns realizadas entre a proteína E e compostos metálicos e não metálicos são em geral do tipo π -alquil, que é uma interação entre a nuvem eletrônica do grupo aromático e um elétron do grupo alquil, do tipo amido- π -stacked e do tipo π - π -T-shaped, sendo esta última uma interação direta com o anel aromático da LEU:19. Como foram observadas muitas interações com a região deste resíduo, foi observado que esta é importante na organização de moléculas, acoplamento do ligante, no dobramento da proteína e no reconhecimento molecular (Alencar *et al.*, 2022). Desse modo, a realização de estudos utilizando a LEU:19 como referencial é uma alternativa viável para a realização dos estudos prospectivos *in silico* da proteína E.

2.4.1 DockThor

O DockThor utiliza uma busca estocástica através de um algoritmo genético não-geracional (*steady-state*) que proporciona uma melhor exploração da hipersuperfície de energia e permite a identificação de múltiplos mínimos/soluções em uma única corrida, preservando a diversidade populacional do estruturas geradas, com um método de hibridação através de algoritmo *Hooke and Jeeves* que juntamente com o campo de força *Merk Molecular Force Field 94s* (MMFF94s) utilizado determina a energia de interação receptor-ligante. Esse sistema utiliza cinco operadores genéticos que possuem uma probabilidade de uso calculada por um método adaptativo (Magalhães *et al.*, 2014).

O processo de ligação, por sua vez, ocorre em função da entropia associada à flexibilidade molecular do ligante e do receptor, podendo ou não apresentar efeitos do solvente utilizado. Essa afinidade de ligação é mensurada através da constante de ligação experimental K_i obtida pela energia livre de Gibbs (ΔG), que pode ser expressa na seguinte equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_i \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde T é a temperatura absoluta, R é a constante dos gases e ΔH e ΔS são, respectivamente, as variações entálpicas e entrópicas entre o receptor e o ligante nos estados ligado e não ligado. Os algoritmos de encaixe para o docking receptor-ligante devem explorar os graus de liberdade do ligante conformacional e configuracional (ou seja, translacional e rotacional) e usar uma função de pontuação que correlacione a energia livre de ligação do receptor-ligante para ordenar as diferentes poses de ligantes e classificar diferentes compostos em experimentos de triagem virtual (Magalhães *et al.*, 2014).

A função de pontuação usada pelo DockThor para pontuar as poses ancoradas é denominada “Energia Total”, que, utilizando o campo de força MMFF94S, se baseia na soma das forças de van der Waals e potenciais eletrostáticos dos seguintes termos: a energia de interação intermolecular entre os pares de átomos proteína-ligante; a energia de interação intramolecular entre os pares de átomos 1-4; e o termo de torção do ligante (Santos *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise *in silico* de compostos tiazolidínicos na viroporina formada pela proteína E para avaliar a efetividade no bloqueio do canal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

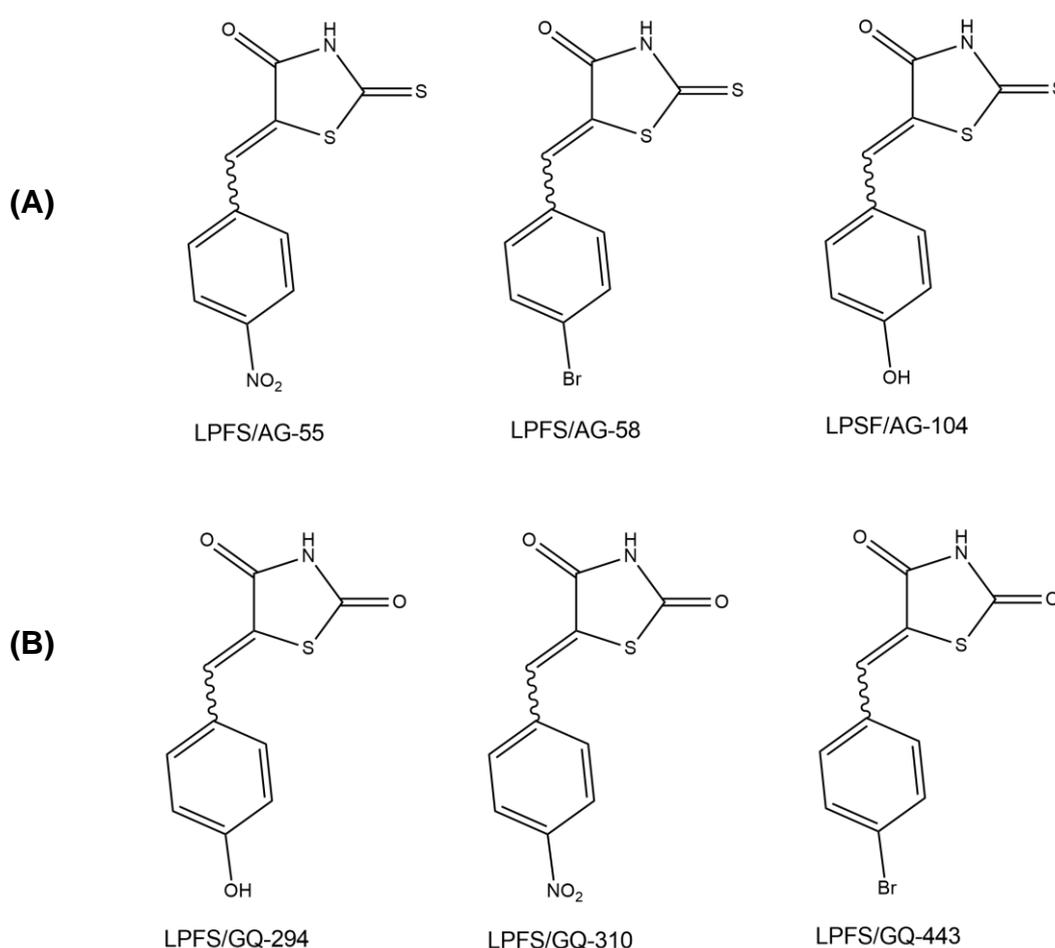
- Analisar a afinidade predita dos derivados tiazolidínicos da série LPSF/GQ e LPSF/AG no sítio ativo da proteína E.
- Ranquear os ligantes com maior potencial terapêutico baseado nas suas respectivas afinidades preditas.
- Avaliar as interações intermoleculares dos ligantes no receptor e identificar as mais relevantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS LIGANTES

As estruturas dos compostos LPFS/AG-55, LPFS/AG-58, LPSF/AG-104, LPSF/GQ-294, LPSF/GQ-310 e LPSF/GQ-443 foram gentilmente cedidas pelo Núcleo de Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG). Foi utilizado o programa Avogadro para converter as estruturas 2D cedidas (Figura 4) para o formato 3D e então, em seguida, submetê-las à minimização de energia utilizando o campo de força MMFF94s.

Figura 4. Compostos tiazolidínicos destinados à análise. (A) Série LPSF/AG e (B) LPSF/GQ.



Fonte: autoria própria (2023).

4.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA

A estrutura da viroporina (ID PDB: 7K3G) utilizada para os estudos de docking molecular foi retirada do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). O processamento das simulações de docking foi realizado com o DockThor versão 2.0 (Magalhães *et al.*, 2014), e as análises foram realizadas no programa Discovery Studio Visualizer.

O estado de protonação dos resíduos do canal foi mantido na condição de pH fisiológico configurado pelo programa. Os valores das coordenadas, para o posicionamento do centro de caixa (*grid center*), utilizados para a realização dos experimentos foram obtidos a partir da média das coordenadas do aminoácido LEU:19 presente em cada uma das cadeias da proteína e estão dispostos na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Média das coordenadas utilizadas para o posicionamento da caixa para docagem na proteína 7K3G (viroporina). O aminoácido de referência foi a LEU:19.

Coordenada	Valor
X	17,489684
Y	0,0381054
Z	0,1222418

Fonte: autoria própria (2023).

4.3 ANCORAGEM E APLICAÇÃO DA FUNÇÃO SCORE

Para os experimentos com o DockThor, os parâmetros padrão da plataforma para docagem foram utilizados, empregando o algoritmo genético com um número máximo de 1.000.000 de avaliações, com um tamanho de população de 750, e em um total de 24 rodadas. O tamanho da caixa de simulação (*grid*) foi de 20x20x20 Å, e, baseado no trabalho de Alencar e colaboradores (2022), o aminoácido de referência para o posicionamento da caixa na viroporina foi o LEU:19. Todas as análises foram feitas em triplicata, com ranqueamento baseado na energia total dos compostos analisados, visto que este parâmetro apresenta maior acurácia de resultados que a afinidade no que se refere à definição das melhores posições de docagem (atracamento) do ligante no sítio de ligação de interesse.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DO DOCKTHOR PARA A SÉRIE LPSF/AG

5.1.1 Série LPSF/AG (Z)

Após a realização dos experimentos nos diastereoisômeros (Z) da série LPSF/AG pelo programa DockThor, o composto que apresentou o melhor desempenho foi o AG-104 com energia total de -3,463 kcal/mol e valor de afinidade de -8,198 kcal/mol, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da energia de afinidade e total obtidos do docking dos diastereoisômeros Z da série LPSF/AG com a viroporina no DockThor.

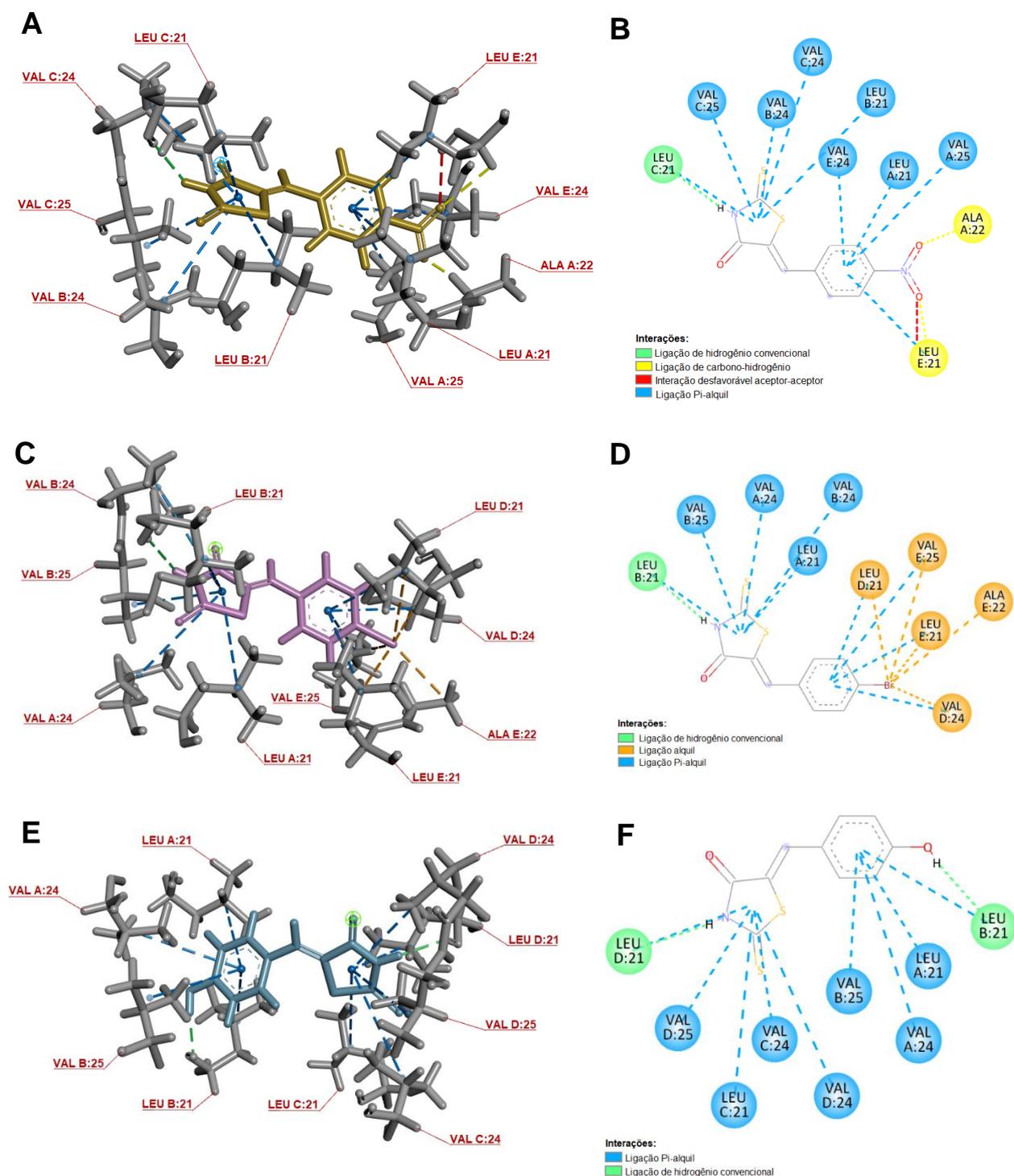
LPSF/AG DIASTEREISÔMEROS Z		
Ligante	parâmetro	Média ± desvio padrão (kcal/mol)
AG-55	afinidade	-7,959 ± 0,000
	energia total	20,097 ± 0,000
AG-58	afinidade	-8,053 ± 0,658
	energia total	1,910 ± 1,870
AG-104	afinidade	-8,198 ± 0,000
	energia total	-3,463 ± 0,000

Fonte: autoria própria (2023).

Para a análise das interações ligante-receptor, foi observada a predominância de ligações Pi-alquil entre todos os ligantes da série com o receptor estudado. Todavia, no fármaco AG-55 (Figuras 5A e 5B) apresentou duas ligações carbono-hidrogênio entre os resíduos ALA A:22 e LEU E:21 com os oxigênios do radical da molécula, e uma ligação de hidrogênio entre o resíduo LEU C:21 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel pentamérico. Além disso, foi observada a presença de uma interação desfavorável entre o AG-55 e uma região do receptor, possível indicativo de repulsão aceptor-aceptor.

Para o composto AG-58 (Figuras 5C e 5D), houve a presença de cinco ligações alquil entre os resíduos LEU D:21, LEU E:21, VAL D:24, VAL E:25 e ALA E:22 com o radical bromo da molécula; e uma ligação de hidrogênio entre o resíduo LEU B:21 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel pentamérico. Já para o fármaco AG-104 (Figuras 5E e 5F) foram relatadas duas ligações de hidrogênio entre os resíduos LEU D:21 e LEU B:21 com os hidrogênios ligados respectivamente ao nitrogênio do anel pentamérico e do radical hidroxila da molécula.

Figura 5. Interações ligante-receptor dos diastereoisômeros (Z) da série LPSF/AG baseado nos resultados da plataforma DockThor no sítio de ligação da viroporina. (A) representação tridimensional do composto AG-55; (B) representação bidimensional do composto AG-55; (C) representação tridimensional do composto AG-58; (D) representação bidimensional do composto AG-58; (E) representação tridimensional do composto AG-104; (F) representação estrutural do composto AG-104.



Fonte: autoria própria (2023).

5.1.2 Série LPSF/AG (E)

Após a coleta de dados dos experimentos realizados nos diastereoisômeros (E) da série LPSF/AG no programa DockThor, o composto que apresentou o melhor desempenho foi o AG-104 com valor de afinidade de -7,928 kcal/mol e energia total de 7,492 kcal/mol como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da energia de afinidade e total obtidos do docking dos diastereoisômeros E da série LPSF/AG com a viroporina no DockThor.

LPSF/AG DIASTEREISÔMEROS E		
Ligante	parâmetro	Média ± desvio padrão (kcal/mol)
AG-55	afinidade	-7,705 ± 0,000
	energia total	37,154 ± 0,000
AG-58	afinidade	-8,200 ± 0,000
	energia total	22,409 ± 0,000
AG-104	afinidade	-7,928 ± 0,000
	energia total	7,492 ± 0,000

Fonte: autoria própria (2023).

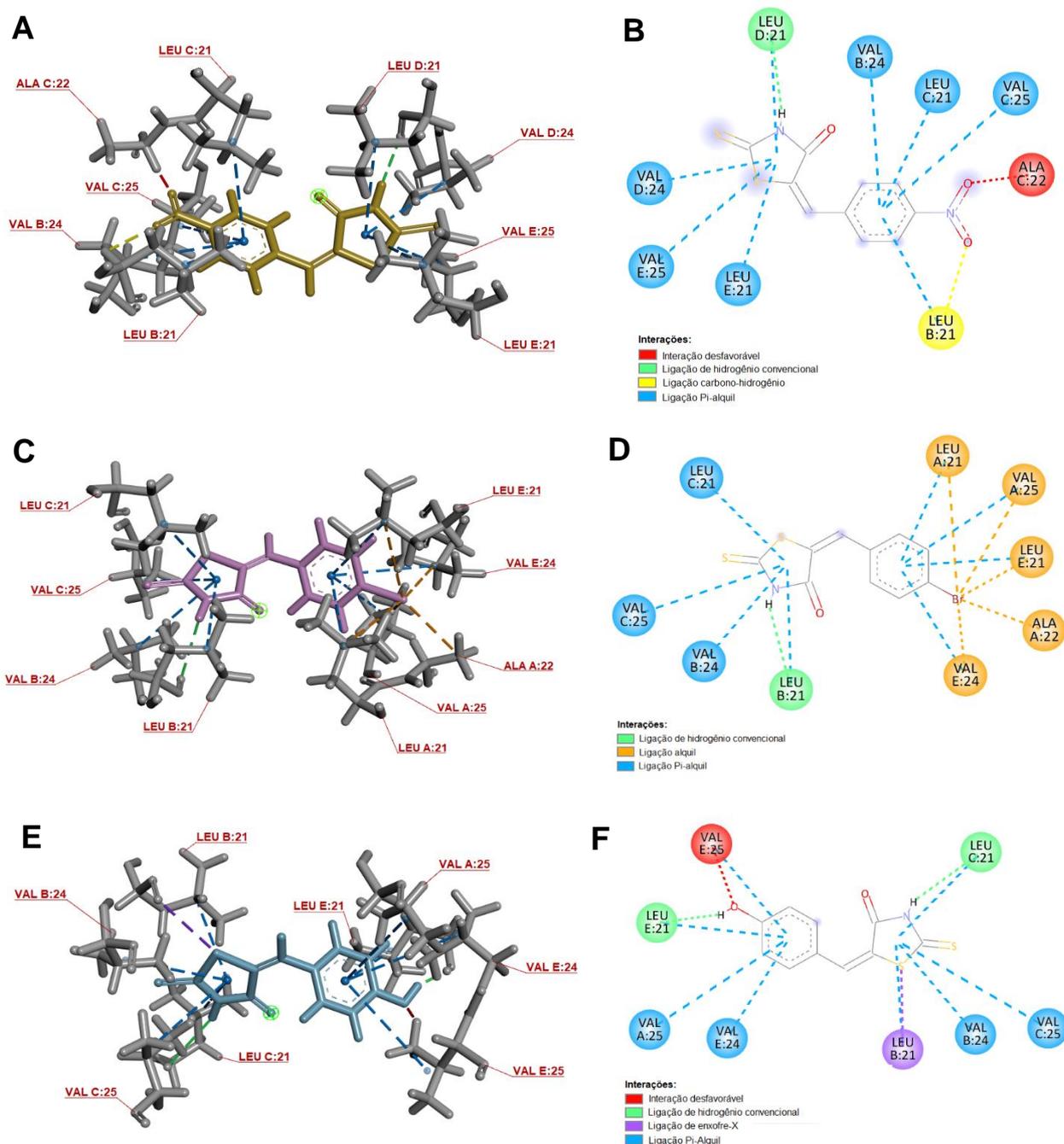
Para a análise das interações ligante-receptor, os compostos estudados apresentaram predominância nas ligações Pi-alquil. No entanto, para o composto AG-55 (Figuras 6A e 6B), houve a ocorrência de ligação de hidrogênio convencional entre o hidrogênio lábil ligado ao nitrogênio do anel pentamérico e o resíduo LEU D:21; e uma ligação carbono-hidrogênio entre o oxigênio do grupo nitro do ligante e o resíduo LEU B:21. Contudo, é possível observar a presença de uma interação desfavorável entre o ligante e o resíduo ALA C:22 o que pode explicar o fraco desempenho desse ligante quando comparados aos demais compostos da mesma série.

No que diz respeito às interações do composto AG-58 (Figuras 6C e 6D), observou-se uma ligação de hidrogênio convencional entre o hidrogênio lábil do nitrogênio presente no anel pentamérico e o resíduo LEU B:21; e numerosas ligações alquil entre o bromo e os resíduos ALA A:22, LEU A:21, LEU E:21, VAL A:25 e VAL E:24.

Para as interações evidenciadas no composto AG-104 (Figuras 6E e 6F), houve duas ligações de hidrogênio convencionais entre o grupamento hidroxila ligado ao anel aromático com o resíduo LEU E:21 e entre o anel pentamérico e o resíduo LEU C:21. Também foi relatada a presença de uma ligação de enxofre-X entre o anel pentamérico e o resíduo LEU B:21. No entanto, houve uma interação desfavorável entre o resíduo VAL E:25 e o oxigênio

do grupamento hidroxila do anel aromático, o que pode justificar o valor elevado de energia total, ainda que menor quando comparado aos demais compostos da mesma série.

Figura 6. Interações ligante-receptor dos diastereoisômeros (E) da série LPSF/AG baseado nos resultados da plataforma DockThor no sítio de ligação da viroporina. (A) representação tridimensional do composto AG-55; (B) representação bidimensional do composto AG-55; (C) representação tridimensional do composto AG-58; (D) representação bidimensional do composto AG-58; (E) representação tridimensional do composto AG-104; (F) representação estrutural do composto AG-104.



Fonte: autoria própria (2023).

5.2 RESULTADOS DO DOCKTHOR PARA A SÉRIE LPSF/GQ

5.2.1 Série LPSF/GQ (Z)

Para a série LPSF/GQ nos seus diastereoisômeros Z, após a coleta de dados dos experimentos *in silico*, observou-se que o ligante GQ-294 apresentou-se como melhor composto por apresentar energia total de -11,617 kcal/mol e afinidade de -7,959 kcal/mol como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da energia de afinidade e total obtidos do docking dos diastereoisômeros Z da série LPSF/GQ com a viroporina no DockThor.

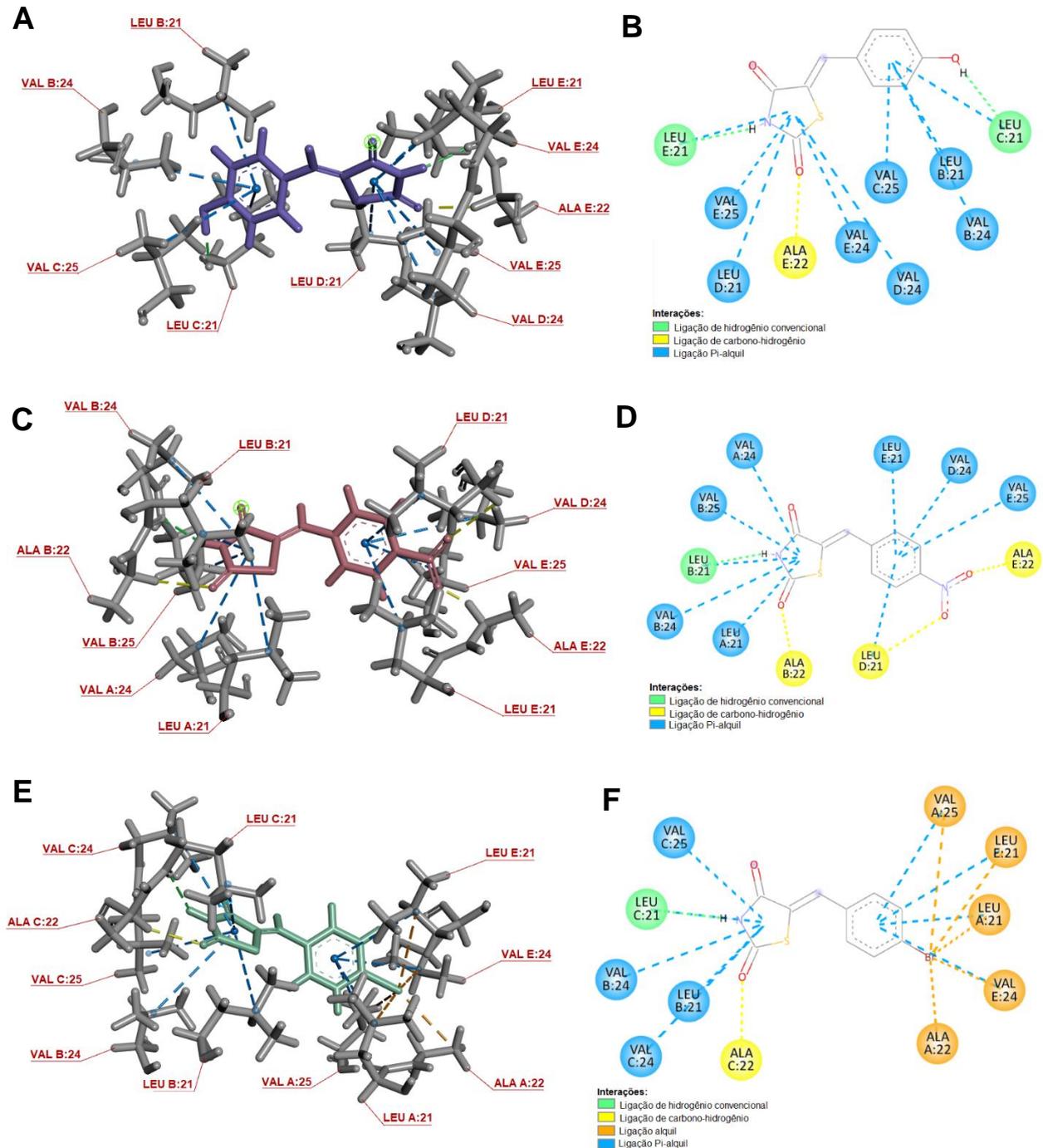
LPSF/GQ DIASTEREISÔMEROS Z		
Ligante	parâmetro	Média ± desvio padrão (kcal/mol)
GQ-294	afinidade	-7,959 ± 0,000
	energia total	-11,617 ± 0,000
GQ-310	afinidade	-7,755 ± 0,001
	energia total	11,335 ± 0,000
GQ-443	afinidade	-8,250 ± 0,000
	energia total	-5,830 ± 0,000

Fonte: autoria própria (2023).

No que se refere às interações ligante-receptor, em todos os compostos houve a predominância de ligações Pi-alquil e ligações carbono-hidrogênio em menor proporção. Contudo, para o fármaco GQ-294 (Figuras 7A e 7B), foram observadas ligações convencionais de hidrogênio entre os resíduos LEU E:21 e LEU C:21 com os hidrogênios ligados respectivamente ao nitrogênio do anel pentamérico e do radical da molécula.

Para os demais compostos apenas uma ligação de hidrogênio convencional foi relatada entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel pentamérico e os resíduos LEU C:21 no ligante GQ443; e LEU B:21 no ligante GQ-310 (Figuras 7C e 7D). No que diz respeito às interações alquil, só foram registradas no ligante GQ-443 (Figuras 7E e 7F) entre os resíduos ALA A:22, LEU A:21, LEU E:21, VAL A:22 e VAL E:24 com o radical bromo da molécula.

Figura 7. Interações ligante-receptor dos diastereoisômeros (Z) da série LPSF/GQ baseado nos resultados da plataforma DockThor no sítio de ligação da viroporina. (A) representação tridimensional do composto GQ-294; (B) representação bidimensional do composto GQ-294; (C) representação tridimensional do composto GQ-310; (D) representação bidimensional do composto GQ-310; (E) representação tridimensional do composto GQ-443; (F) representação estrutural do composto GQ-443.



Fonte: autoria própria (2023).

5.2.2 Série LPSF/GQ (E)

Para a série LPSF/GQ, após a coleta de dados dos experimentos *in silico* realizados com os diastereoisômeros E, observou-se que o ligante GQ-294 apresentou-se como melhor composto por apresentar energia total de -4,782 kcal/mol e afinidade de -7,837 kcal/mol como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 5. Resultados da energia de afinidade e total obtidos do docking dos diastereoisômeros E da série LPSF/GQ com a viroporina no DockThor.

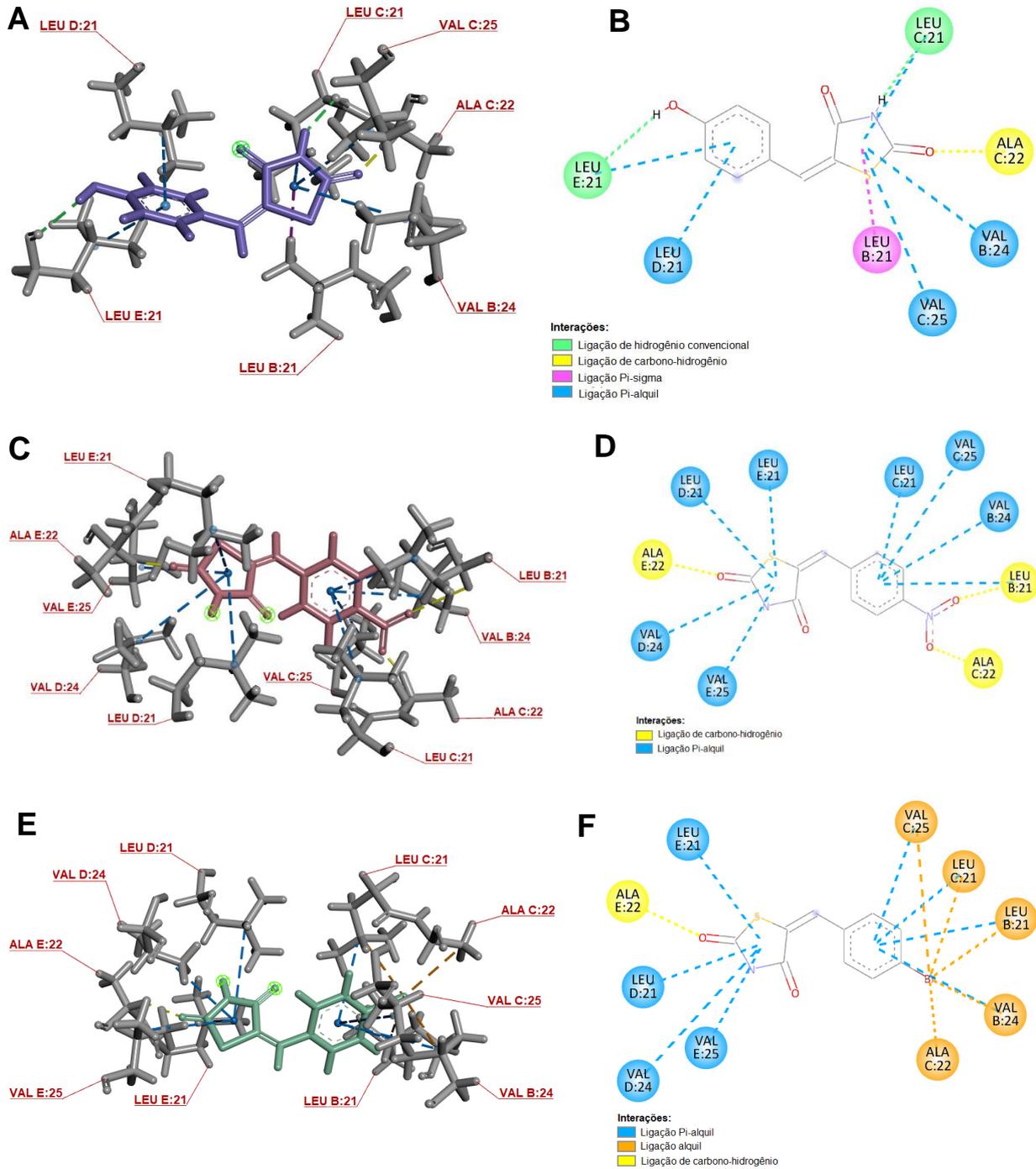
LPSF/GQ DIASTEREOISÔMEROS E		
Ligante	parâmetro	Média ± desvio padrão (kcal/mol)
GQ-294	afinidade	-7,837 ± 0,000
	energia total	-4,782 ± 0,000
GQ-310	afinidade	-7,710 ± 0,000
	energia total	17,501 ± 0,000
GQ-443	afinidade	-8,219 ± 0,000
	energia total	1,028 ± 0,000

Fonte: autoria própria (2023).

No que se refere às interações ligante-receptor, em todos os compostos houve a predominância de ligações Pi-alquil. Contudo, para o composto GQ-294 (Figuras 8A e 8B) houve a presença de duas ligações de hidrogênio convencionais entre a hidroxila do anel aromático com o resíduo LEU E:21 e entre o anel pentamérico com o resíduo LEU C:21. Além disso, foi observada uma ligação carbono-hidrogênio entre o grupamento carbonila do ligante e o resíduo ALA C:22; e uma ligação Pi-sigma entre o anel pentamérico e o resíduo LEU B:21.

Para o composto GQ-310 (Figuras 8C e 8D), é possível observar que além das diversas ligações Pi-alquil houve a presença de três ligações de carbono-hidrogênio entre o oxigênio da carbonila presente no anel pentamérico e o resíduo ALA E:22; e entre os dois oxigênios do grupamento e os resíduos ALA C:22 e LEU B:21 respectivamente. Por fim, pode-se observar que entre as interações do composto GQ-443 (Figuras 8E e 8F), é possível destacar a presença de uma ligação carbono-hidrogênio entre o grupo carbonila do anel pentamérico e o resíduo ALA E:22; e numerosas ligações alquil a entre os resíduos ALA C:22, LEU B:21, LEU C:21, VAL B:24 e VAL C:25 com o radical bromo da molécula.

Figura 8. Interações ligante-receptor dos diastereoisômeros (E) da série LPSF/GQ baseado nos resultados da plataforma DockThor no sítio de ligação da viroporina. (A) representação tridimensional do composto GQ-294; (B) representação bidimensional do composto GQ-294; (C) representação tridimensional do composto GQ-310; (D) representação bidimensional do composto GQ-310; (E) representação tridimensional do composto GQ-443; (F) representação estrutural do composto GQ-443.



Fonte: autoria própria (2023).

5.3 ANÁLISE COMPARATIVA

Levando em consideração todos os experimentos computacionais e análises realizados, as ligações mais fortes com interação favorável ao bloqueio do canal foram as ligações de hidrogênio, caracterizadas principalmente pela interação do hidrogênio dos grupos doadores de elétrons (nitrogênio ou oxigênio) presentes nos ligantes e o oxigênio aceptor de elétrons presente nos resíduos do canal (Gómez-Jeria *et al.*, 2020). As interações carbono-hidrogênio, em que há carbonos polarizados nos resíduos atuando como doadores de elétrons por se encontrarem próximos aos oxigênios presentes nos ligantes (Bissantz; Kuhn; Stahl, 2010).

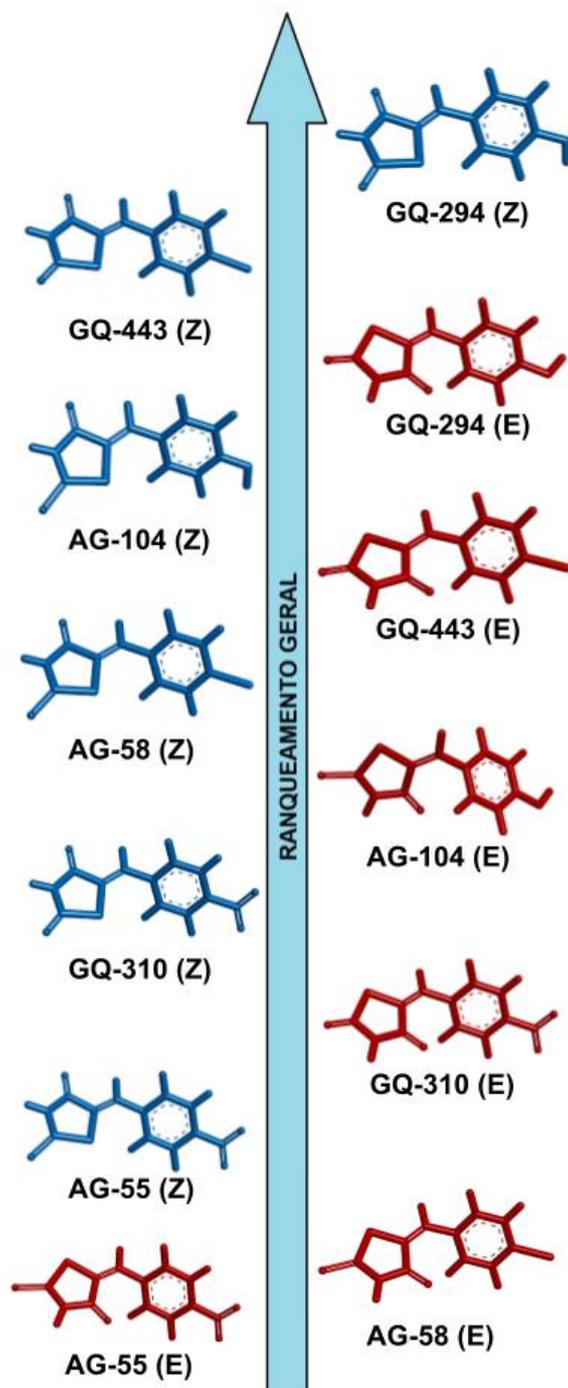
Ademais, houve predominância de interações Pi-alquil, que se caracteriza pela interação dos anéis Pi com carbonos hibridizados em sp² dos ligantes e os grupamentos alquila dos resíduos do canal. Já as ligações alquil, aqui caracterizadas como grupamentos alquil dos resíduos do canal que interagem com os radicais bromo dos ligantes (Gómez-Jeria *et al.*, 2020). Estes dois tipos de ligação, ainda que sejam interessantes para a manutenção da estabilidade do ligante na proteína, são mais fracos que as ligações de hidrogênio.

Além dessas relações mais predominantes foram observadas também uma ligação Pi-sigma, que se caracterizam como interações fracas entre um sistema de anel π fazendo onde o hidrogênio doador esteja conectado a um carbono não aromático aqui representado pelo resíduo envolvido (Cabaleiro-Lago; Rodríguez-Otero, 2018), e uma ligação de enxofre-X, que pode ser interpretada como as relações entre o enxofre divalente e átomos de N, O ou S (Gómez-Jeria *et al.*, 2020).

De acordo com uma análise comparativa entre os seis compostos estudados e seus respectivos grupos de diastereoisômeros, o melhor composto elencado foi o GQ-294 (Z) como pode ser observado na figura 7. Além de apresentar o menor valor absoluto de energia total, o GQ-294 (Z) tem uma disposição espacial mais favorável com ligações de hidrogênio convencionais em pontos opostos do ligante e uma ligação de carbono-hidrogênio, o que proporciona uma ancoragem mais efetiva que estruturas como o GQ-294 (E) (Figura 8), que mesmo possuindo duas ligações de hidrogênio e um bom valor absoluto de energia total, apresenta interações com menor distribuição espacial. Esse aspecto pode indicar que o maior número de interações Pi-alquil favorece uma melhor ancoragem no canal.

Ao comparar os valores de energia total de todos os compostos avaliados neste estudo, foi possível ranquear do menos ao mais favorável de interagir efetivamente no bloqueio do canal (Figura 9).

Figura 9. Ranqueamento geral dos compostos analisados. Os fármacos estão ordenados em ordem crescente de energia total, destacando os diastereoisômeros (Z) em azul e os diastereoisômeros (E) em vermelho.



Fonte: autoria própria (2023).

No caso da segunda posição ranqueada, o GQ-443 (Z) (Figura 7), ainda que apresente uma boa distribuição de interações com destaque para as ligações alquil com o bromo devido ao seu grande raio atômico, só apresenta uma ligação de hidrogênio de interesse quando comparado à melhor molécula ranqueada. Uma resposta diferente foi

observada no GQ-443 (E) (Figura 8), de modo que, a disposição espacial diferenciada ocasionou a perda de uma ligação de hidrogênio, o que repercutiu no valor positivo de energia total do diastereoisômero em questão.

Quando se analisa o composto AG-104 (Z) (Figura 5), há algumas similaridades com o GQ-294 (Z) como a presença de uma disposição de interações similares, diferindo apenas na perda de uma interação, sendo energeticamente favorável. No entanto, quando o AG-104 (E) (Figura 6) é observado, é possível perceber que a posição espacial afeta negativamente na ligação com o receptor uma vez que se forma uma interação desfavorável entre o resíduo VAL E:25 e a hidroxila do fármaco que, por sua vez, também está realizando uma ligação de hidrogênio convencional com o resíduo LEU E:21. Como resultado desse desfavorecimento, a energia total necessária para a realização da ligação aumenta consideravelmente e diminui a interação ligante-receptor da molécula.

Já nos compostos que se encontram nas regiões intermediárias do ranqueamento, o fármaco GQ-310 (Z) (Figura 7) apresenta melhor desempenho que seu diastereoisômero (E) por apresentar uma ligação de hidrogênio convencional a mais, o que garante uma posição acima. No entanto, a energia total necessária para a interação desses dois diastereoisômeros os torna menos efetivos em geral. Já no caso do composto AG-58 (Z) (Figura 5), o posicionamento e a quantidade das interações é o grande fator que diminui a energia total desse fármaco quando comparado ao seu diastereoisômero (E), uma vez que apresenta mais ligações Pi-alquil.

Quando as posições mais inferiores do ranqueamento são analisadas, há a presença de duas estruturas com interações desfavoráveis. No composto AG-55 (Z) (Figura 5), a interação citada ocorre entre o oxigênio do grupo nitro com a LEU E:21; enquanto que no composto AG-55 (E) (Figura 6) ocorre entre oxigênio do grupo nitro e a ALA C:22, o que pode indicar repulsão entre os ligantes e essas regiões do receptor, tendo por consequência o aumento da energia total para a realização das interações e, por consequência, perda da possível efetividade no bloqueio do canal.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante a utilização de métodos computacionais, foram adquiridos resultados significativos acerca das moléculas estudadas das séries LPSF/AG e LPSF/GQ. Desse modo pode-se inferir que o melhor composto foi o GQ-294 (Z), por apresentar melhor valor absoluto de energia total e melhor afinidade, favorecido pela disposição espacial e ligações de hidrogênio em sentidos opostos.

No que se refere aos compostos GQ-443 (Z) e AG-104 (Z), os dois apresentaram bons resultados, diferindo poucas interações da melhor estrutura. Todos os diastereoisômeros dos compostos GQ-310 e AG-58 apresentaram elevados valores de energia total mesmo apresentando boa disposição espacial, e os compostos AG-104 (E), AG-55 (Z) e AG-55 (E) apresentaram interações desfavoráveis que podem indicar repulsão ligante-receptor.

Portanto, é válido ressaltar que os compostos destinados à análise, com destaque para o GQ-294 (Z), apresentam um bom potencial no bloqueio da viroporina formada pela proteína E do SARS-CoV-2. No entanto, vale salientar que novos estudos posteriores são necessários para comprovar a efetividade apontada nas análises computacionais realizadas, para que o uso destes compostos seja viabilizado para prospecção de novas alternativas terapêuticas no tratamento e diminuição dos casos a longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, Wilson Luna Machado et al. Interactions of Co, Cu, and non-metal phthalocyanines with external structures of SARS-CoV-2 using docking and molecular dynamics. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 3316, 2022.
- BAI, Zhihua et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1115, 2021.
- BAHARE, Radhe Shyam et al. Synthesis, HIV-1 RT inhibitory, antibacterial, antifungal and binding mode studies of some novel N-substituted 5-benzylidene-2, 4-thiazolidinediones. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, p. 1-15, 2015.
- BEGUM, A. Bushra et al. Synthesis, Antioxidant, and Xanthine Oxidase Inhibitory Activities of 5-[4-[2-(5-E thyl-2-pyridinyl) ethoxy] phenyl] methyl]-2, 4-thiazolidinedione Derivatives. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 4, p. 247-255, 2014.
- BISSANTZ, Caterina; KUHN, Bernd; STAHL, Martin. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061-5084, 2010.
- BEEDKAR, Supriya D. et al. Novel thiazolo-pyrazolyl derivatives as xanthine oxidase inhibitors and free radical scavengers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 4, p. 947-956, 2012.
- BONZANO, Chiara et al. Doxycycline: from ocular rosacea to COVID-19 anosmia. New insight into the coronavirus outbreak. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 200, 2020.
- CABALEIRO-LAGO, Enrique M.; RODRIGUEZ-OTERO, Jesus. On the Nature of σ - σ , σ - π , and π - π Stacking in Extended Systems. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 9348-9359, 2018.
- CAO, Yipeng et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. **Protein Science**, v. 30, n. 6, p. 1114-1130, 2021.
- CHAURASYIA, Abhishek et al. Rhodanine derivatives: An insight into the synthetic and medicinal perspectives as antimicrobial and antiviral agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 101, n. 3, p. 500-549, 2023.
- DEY, Debajit; BORKOTOKY, Subhomoi; BANERJEE, Manidipa. In silico identification of Tretinoin as a SARS-CoV-2 envelope (E) protein ion channel inhibitor. **Computers in Biology and Medicine**, v. 127, p. 104063, 2020.
- EWART, Gary D. et al. Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. **European Biophysics Journal**, v. 31, p. 26-35, 2002.
- GÓMEZ-JERIA, Juan S. et al. Some remarks about the relationships between the common skeleton concept within the Klopman-Peradejordi-Gómez QSAR method and the weak molecule-site interactions. **Chemistry Research Journal**, v. 5, n. 2, p. 32-52, 2020.
- HIDALGO-FIGUEROA, Sergio et al. Discovery of Thiazolidine-2, 4-Dione/Biphenylcarbonitrile Hybrid as Dual PPAR α/γ Modulator with Antidiabetic Effect: In

vitro, In Silico and In Vivo Approaches. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 4, p. 474-483, 2013.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

JACKSON, Cody B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

KADAM, Swapnil B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 180-202, 2021.

KAMINSKY, D. V. Screening of the antiviral activity in the range of C5 and N3 substituted 4-thiazolidinone derivatives. **Journal Of Organic And Pharmaceutical Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 250, p. 64-69, 10 jun. 2015. National University of Pharmacy.

KIRTIPAL, Nikhil; BHARADWAJ, Shiv; KANG, Sang Gu. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104502, 2020.

KUMAR, Harsh; DEEP, Aakash; MARWAHA, Rakesh K. Chemical synthesis, mechanism of action and anticancer potential of medicinally important thiazolidin-2, 4-dione derivatives: A review. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 1474-1516, 2019.

LI, Xingguang et al. Potential of large "first generation" human-to-human transmission of 2019-nCoV. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 448-454, 2020.

LIU, Yu et al. Design, synthesis and biological activity of thiazolidine-4-carboxylic acid derivatives as novel influenza neuraminidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 2342-2348, 2011.

LONG, Nathan; LE GRESLEY, Adam; WREN, Stephen P. Thiazolidinediones: an in-depth study of their synthesis and application to medicinal chemistry in the treatment of diabetes mellitus. **ChemMedChem**, v. 16, n. 11, p. 1717-1736, 2021.

MADAN, Vanessa et al. Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. **FEBS Letters**, v. 579, n. 17, p. 3607-3612, 2005.

MAGALHÃES, Camila Silva de et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206-224, 2014.

MATSUYAMA, Shutoku *et al.* Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 84, n. 24, p. 12658-12664, 15 dez. 2010. American Society for Microbiology.

MONTELEONE, Stefania et al. Fighting COVID-19 with artificial intelligence. **Artificial Intelligence in Drug Design**, p. 103-112, 2022.

NG, H. H. et al. Doxycycline treatment attenuates acute lung injury in mice infected with virulent influenza H3N2 virus: involvement of matrix metalloproteinases. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 92, n. 3, p. 287-295, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <covid19.who.int>. Acesso em: 30 ago. 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Folha informativa sobre COVID-19**. 2023. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19>>. Acesso em: 31 ago. 2023.

OXFORD, John S.; GALBRAITH, Alan. Antiviral activity of amantadine: a review of laboratory and clinical data. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 11, n. 1, p. 181-262, 1980.

PALÚ, Isabela de Assis. A virologia do Sars-CoV-2. **Revista Connection Line**, n. 25, 2021.

RUSS, William P.; ENGELMAN, Donald M. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 3, p. 911-919, 2000.

SANTOS, Karina B. et al. Highly flexible ligand docking: Benchmarking of the DockThor program on the LEADS-PEP protein-peptide data set. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 667-683, 2020.

SANTOS, Suzana de Siqueira et al. Machine learning and network medicine approaches for drug repositioning for COVID-19. **Patterns**, v. 3, n. 1, 2022.

SAVOV, Varban M. et al. Effects of rutin and quercetin on monooxygenase activities in experimental influenza virus infection. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 58, n. 1, p. 59-64, 2006.

SIDDIQUI, Sazada; ALHAMDI, Heba Waheeb Saeed; ALGHAMDI, Huda Ahmed. Recent chronology of COVID-19 pandemic. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 778037, 2022.

TEESE, Mark G.; LANGOSCH, Dieter. Role of GxxxG motifs in transmembrane domain interactions. **Biochemistry**, v. 54, n. 33, p. 5125-5135, 2015.

TRIPATHI, Avinash C. et al. 4-Thiazolidinones: the advances continue.... **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52-77, 2014.

TO, Janet; SURYA, Wahyu; TORRES, Jaume. Targeting the channel activity of viroporins. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 104, p. 307-355, 2016.

WILSON, Lauren; GAGE, Peter; EWART, Gary. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. **Virology**, v. 353, n. 2, p. 294-306, 2006.

WONG, Nicholas A.; SAIER JR, Milton H. The SARS-coronavirus infection cycle: a survey of viral membrane proteins, their functional interactions and pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1308, 2021.

YALCINKAYA, Mustafa et al. Modulation of the NLRP3 inflammasome by Sars-CoV-2 Envelope protein. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-12, 24 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

YE, Xin et al. Synthesis and enzymatic inhibition effects of thiazolidinedione 3C-like protease inhibitors. **Journal Of Chemical Research**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 174751982311525, jan. 2023. SAGE Publications.

YOUSSEF, Amal M. et al. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazolyl-2, 4-thiazolidinediones as anti-inflammatory and neuroprotective agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 2019-2028, 2010.n. 5, p. 2019-2028, 2010.