

Análise in silico do Remdesivir no tratamento da coagulopatia da COVID-19

In silico analysis of Remdesivir in the treatment of COVID19 coagulopathy

RESUMO

A atual pandemia de COVID-19 iniciou pelo relato de pneumonia com origem desconhecida em pacientes de Wuhan na China. O patógeno foi sequenciado e caracterizado no grupo dos Coronavírus e denominado inicialmente 2019-nCoV e posteriormente, como SARS-CoV-2. Sua apresentação clínica foi denominada COVID-19, cujos sintomas variam de leves a severos, como a síndrome respiratória aguda e coagulopatia intravascular disseminada. O tratamento feito com a associação de medicamentos tem mostrado efeito promissor para o antiviral remdesivir frente a doença, incluindo o quadro de coagulopatia. Neste trabalho foram estudadas possíveis interações existentes entre o antiviral remdesivir com algum dos fatores de coagulação II protrombina (3U69) e III tromboplastina (5W06) através da docagem molecular. Os dados e informações obtidos acerca das interações químicas indicam que esse ligante apresenta afinidade com o receptor, sustentada principalmente por ligações de hidrogênio, podendo assim interferir na atividade desses fatores de coagulação, funcionando como um anticoagulante, e por consequência, trazer benefícios para o tratamento de pacientes infectados com COVID-19 e em condições de coagulopatia intravascular disseminada.

PALAVRAS-CHAVE: Agentes antivirais. Bioinformática. Sangue-Distúrbios de coagulação.

ABSTRACT

The current COVID-19 pandemic was originated in Wuhan, China, where a cluster of patients infected with an unknown pneumonia emerged. The pathogen was sequenced and characterized as belonging to the coronavirus family. It was initially named 2019-nCoV and later its name was changed to SARS-CoV-2. Its clinical presentation is called COVID-19 and it may affect different people in different ways. The symptoms vary from mild to severe, such as severe acute respiratory syndrome and disseminated intravascular coagulopathy. Combination therapy has shown a promising effect for the antiviral drug remdesivir against the disease, including coagulopathy. The possible interactions between the antiviral drug remdesivir and the coagulation factors prothrombin (3U69) and thromboplastin (5W06) were studied through molecular docking. The data obtained on the chemical interactions between remdesivir and the receptors imply that this ligand has sustained affinity with the receptors. This is mainly because of the hydrogen ligands. For this reason, remdesivir may be able to act as an anticoagulant and interfere in the activity of these coagulation factors, consequently, bringing benefits to the treatment of patients infected with COVID-19 and in the conditions of disseminated intravascular coagulopathy.

KEYWORDS: Antiviral agents. Bioinformatics. Blood-coagulation disorders.

Gabrielle Caroline Peiter

peitergabrielle@gmail.com

Universidade Federal do Paraná –
Setor Palotina, Toledo, Paraná,
Brasil.

Kádima Nayara Teixeira

kadimateixeira@ufpr.br

Universidade Federal do Paraná –
Campus Toledo, Toledo, Paraná,
Brasil.

Cinthia Façanha Wendel

cinthiawendel@gmail.com

Universidade Federal do Paraná –
Campus Toledo, Toledo, Paraná,
Brasil.

Anderson Dillmann Groto

andersongr01@gmail.com

Universidade Federal do Paraná –
Campus Toledo, Toledo, Paraná,
Brasil.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Em Wuhan (China), em dezembro de 2019, foram registrados casos de infecção por um novo coronavírus (BBC, 2020). Após ser identificado, o vírus foi nomeado pelos pesquisadores chineses como Coronavírus Wuhan ou novo coronavírus 2019 (2019-nCov). Posteriormente, o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) renomeou o 2019-nCov, chamando-o como Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus-2 (SARS-CoV-2), e a Organização Mundial de Saúde anunciou um novo nome para a doença causada por esse vírus: COVID19 (SHEREEN et al., 2020; GORBALENYA et al., 2020).

A COVID-19 possui um amplo espectro de apresentações clínicas, variando desde casos assintomáticos, passando por casos com sintomatologia leve onde nenhuma intervenção se faz necessária, até casos muito graves de síndrome respiratória aguda grave (ARENTS et al., 2020). Apesar da maioria dos casos apresentar uma boa evolução clínica, a mortalidade em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva pode chegar a 70% (THOMAS-RÜDDEL et al., 2020).

Tendo em vista este complexo cenário clínico, o Ministério da Saúde do Brasil implementou medidas para diminuir a disseminação do SARS-CoV-2. O objetivo de tais ações é reduzir drasticamente o número de infectados, bem como o número de hospitalizações e mortes pela COVID-19 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A pandemia da COVID-19 claramente expõe as fragilidades estruturais e os pontos de estrangulamento do Sistema Único de Saúde (SUS), como a ausência ou a distribuição desigual das unidades e serviços do SUS, de profissionais da saúde e de infraestrutura da atenção de média e alta complexidade no território brasileiro. Isso influencia diretamente na limitação da capacidade de realização de testes diagnósticos para COVID-19 (OLIVEIRA et al., 2020).

Embora a mortalidade geral por COVID-19 seja de apenas 2,3%, em pacientes críticos ela pode chegar próximo dos 50% (WU & MCGOOGAN, 2020), o que torna essa doença uma preocupação para a saúde pública, em especial no Brasil, onde a população sofre de grande desigualdade econômica, visto que populações de baixa renda tornam-se mais vulneráveis à crises nesse setor (CARVALHO et al., 2020).

O diagnóstico da COVID-19 é feito com base em critérios clínicos, pela avaliação médica, e de forma definitiva pela coleta de materiais respiratórios (swab nasal ou indução de escarro), que passam por análise laboratorial para a detecção de material genético do vírus pela técnica de Transcrição reversa pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-qPCR) (LIMA, 2020).

No entanto esses métodos diagnósticos ainda não estão amplamente e igualmente distribuídos pelo país o que se torna um problema para impedir o aumento dos casos de COVID-19, uma vez que as principais medidas de controle até o momento são o diagnóstico imediato e o isolamento dos pacientes (OLIVEIRA et al., 2020). Ainda segundo Oliveira colaboradores (2020), é importante e necessário o desenvolvimento de mais estudos para compreender os fatores envolvidos no agravamento dos casos e nos óbitos dos pacientes.

Os autores Liu & Li (2020) elaboraram um estudo e escreveram um artigo visando debate acadêmico, sobre a fisiopatologia do SARS-CoV-2, que estaria relacionada à dissociação do átomo de ferro do grupo heme da hemoglobina. Além disso, pacientes infectados pela COVID-19 frequentemente apresentam aumento e queda tanto do tempo de protrombina como do tempo de tromboplastina parcial ativada, o que sugere ativação da coagulação e coagulopatia consumptiva (HARENBERG & FAVALORO, 2020).

Atualmente não existem medicamentos específicos, com eficácia comprovada cientificamente para prevenir ou tratar a COVID-19. Os indivíduos infectados são tratados em isolamento domiciliar para alívio dos sintomas, com a associação de vários medicamentos, muitos dos quais ainda são cientificamente controversos; os quadros mais graves, principalmente os de insuficiência respiratória, são direcionados ao internamento hospitalar (OPAS, 2020).

Deste ponto de vista, a definição de um tratamento ou medicamento eficaz se torna muito importante para a contenção da pandemia. A modelagem molecular e a análise de interação de drogas com possíveis alvos biológicos, baseadas em sua estrutura é um campo proeminente envolvendo medicina e química. O processo para a descoberta de moléculas biologicamente ativas com o auxílio da informática, ou Virtual Screening (ANDRICOPULO, OLIVA & GUIDO, 2008) e a determinação de características químicas como afinidade e seletividade, realizadas com o auxílio do molecular docking são úteis na identificação de moléculas em testes clínicos experimentais (SALUM, POLIKARPOV & ANDRICOPULO, 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos receptores e ligantes

Os modelos utilizados para as análises in silico fazem parte da cascata de coagulação humana. As estruturas utilizadas são estruturas de proteínas já resolvidas retiradas do banco de dados Protein data bank (PDB), sendo elas as estruturas 3U69 (protrombina) com resolução de 1,55 Å e 5W06 (tromboplastina) com resolução de 2,60 Å.

Estas estruturas (denominadas tecnicamente de receptores) foram preparadas para a docagem molecular utilizando o programa AutoDock Tools (<http://autodock.scripps.edu/>). Os ligantes presentes nos receptores e as moléculas de água provenientes da técnica de cristalização para resolução da estrutura por difração de raios X foram removidos nesta etapa. Posteriormente foram adicionados átomos de hidrogênios faltantes aos receptores, dado que o software não os detecta. O arquivo final foi salvo com a extensão .pdbqt.

A etapa seguinte foi a determinação da localização e das dimensões do Grid (caixa virtual que delimita a região onde o ligante realizará as possíveis interações com receptor). Os dados de dimensão e localização do Grid foram salvos em um arquivo com a extensão .txt.

A estrutura química tridimensional do antiviral remdesivir (ligante) utilizada para o molecular docking foi obtida no banco de moléculas Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A análise do estado de protonação do ligante foi feita pelo programa MarvinSketch.

O ligante foi preparado para a docagem molecular no programa AutoDock Tools, o qual detectou os pontos de torção da molécula e realizou o cálculo do ângulo das torções. O arquivo da estrutura do ligante foi salvo na extensão .pdbqt.

A docagem molecular foi realizada pelo Autodock Vina (<http://vina.scripps.edu>). Para realizar a docagem molecular foi gerado um comando com as informações do receptor, do ligante e das dimensões do Grid para o programa AutoDock Vina. Após o processamento das informações e a conclusão dos processos de docagem molecular, os arquivos obtidos foram analisados no programa PyMol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A docagem molecular foi utilizada para analisar, em nível molecular, se existe interação entre o fármaco antiviral remdesivir com algum dos os fatores de coagulação, II protrombina (3U69) e III tromboplastina (5W06) e caso esta interação exista, qual seria a finidade e local e tipos de interação. Dessa forma, a simulação ajuda a entender melhor a dinâmica de interação entre a proteína e o ligante (MENG et al., 1992).

Após a análise do estado de protonação do ligante remdesivir (PubChem 121304016), foram obtidos nove estados, sendo que o primeiro estado de protonação apresentou maior dominância (99,85%) em pH 7,4, o qual por ser o pH fisiológico consegue mimetizar de forma mais confiável o comportamento do antiviral no organismo humano.

A afinidade de interação calculada pelo AutoDock Vina foi de -8,4 kcal/mol para o complexo formado pela protombina com remdesivir e -8,2 kcal/mol para a tromboplastina com remdesivir. Estes valores são considerados significativos visto que valores menores que -6,0 kcal/mol já constituem interações estáveis em análise in silico (SHITYAKOV, FÖRSTE, 2014).

O remdesivir recentemente foi reconhecido como um antiviral promissor para tratamento de uma ampla gama de vírus de RNA. Este fármaco é um análogo de adenosina, que se incorpora na fita de RNA viral nascente causando uma terminação pré-matura (WHANG et al., 2020). Testes clínicos realizados com o remdesivir, in vitro e in vivo, têm demonstrado resultados satisfatórios para o tratamento da COVID-19 (GUO, 2020).

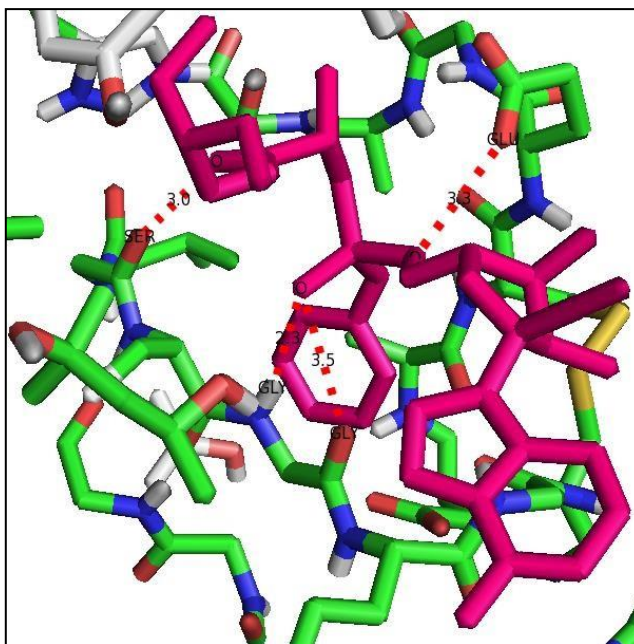
No pulmão o SARS-CoV-2 pode causar pneumonia viral intersticial, síndrome da tempestade de citocinas que causa uma resposta inflamatória sistêmica e coagulação intravascular disseminada, que em muitos casos são fatais. Na ausência de uma terapia de eficácia comprovada, a gestão atual consiste em uso de drogas existentes como antivirais, antiparasitários, anti-inflamatórios, oxigenoterapia, heparina e plasma convalescente (CONTINIA et al., 2020).

A coagulopatia intravascular disseminada tem sido uma das principais preocupações devido à sua gravidade. A patogênese da coagulopatia induzida pela COVID-19 ainda não foi totalmente elucidada, entretanto a produção excessiva de citocinas pro-inflamatórias, aumento de padrões associados a danos (DAMPs), estímulo de mecanismos de morte celular e danos no endotelial vascular são as principais causas, em infecções graves. Na COVID-19 há um aumento prolongado

de biomarcadores relacionados à elementos da cascata de coagulação, como a fibrina, tempo de protrombina e de tromboplastina (IBA et al., 2020).

Por meio da docagem molecular foi possível observar que o remdesivir interage com a protrombina por meio de quatro interações de caráter polar, com comprimento variando de 2,3 a 3,5 Å. (Figura 1 e Tabela 1). Essas interações possivelmente impedem a ação do Fator Xa que converte a protrombina em trombina. Uma das funções da trombina está envolvida com a formação de fibrina e consequentemente do coágulo sanguíneo. Deste modo, em um caso descontrolado de coagulação, a ação do remdesivir poderia ser benéfica.

Figura 1 – Remdesivir em rosa ligado ao fator de coagulação II protrombina (3U69)



Fonte: Os Autores (2020).

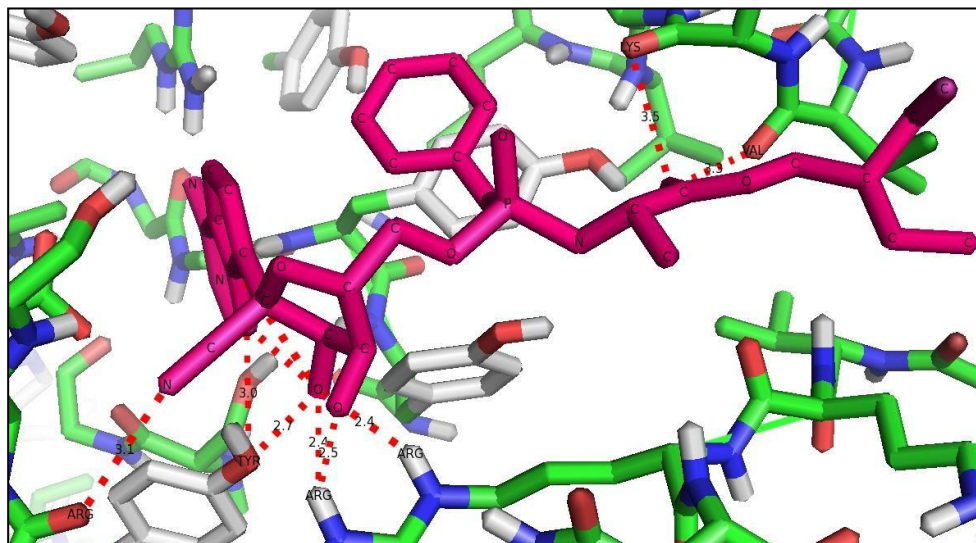
Tabela 1 – Características das interações entre o remdesivir e o ao fator de coagulação II protrombina (3U69)

Interação remdesivir: resíduo	Distância (Å)	Categoria	Tipo de ligação
O: SER-546	3,0	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
O: GLU-522	3,3	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
O: GLY-548	2,3	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
O: GLY-548	3,5	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio

Fonte: Os Autores (2020).

A tromboplastina, também conhecida como fator de coagulação III ou Fator tissular, realizou oito interações polares com o remdesivir (Figura 2), todas variando entre 2,4 e 3,5 Å, (Tabela 2). Essa enzima, quando ativada, hidrolisada a protrombina, na presença de cálcio, interfere no processo de coagulação sanguínea. Em condições de colagulopatia intravascular disseminada o uso do remdesivir traria benefícios para o prognóstico de pacientes infectados com COVID-19.

Figura 2 – Remdesivir em rosa ligado ao fator de coagulação III tromboplastina (5W06)



Fonte: Os Autores (2020).

Tabela 2 – Características das interações entre remdesivir e a Tromboplastina (5W06)

Interação remdesivir: resíduo	Distância (Å)	Categoria	Tipo de ligação
O: LYS-65	3,5	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
O: VAL-64	3,3	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
N: ARG-60	3,1	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
N: TYR-55	3,0	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
O: TYR-55	2,7	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
O: ARG-136	2,4	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio
O: ARG-136	2,5	Hidrofílico	Ligação de hidrogênio

Fonte: Os Autores (2020).

CONCLUSÃO

A COVID-19 é uma patologia que claramente apresenta um quadro clínico bastante diversificado. Muitos sintomas são compatíveis com outras infecções virais e esse fato dificulta o diagnóstico clínico, o que torna necessária a associação ao diagnóstico laboratorial. A suspeita inicial de COVID-19 é suficiente para a conduta de isolamento do paciente e início de uma terapêutica constituída pela associação de vários fármacos inespecíficos, que de acordo com o grau de severidade, tem resultado bastante satisfatório. No caso de pacientes graves hospitalizados em UTI devido à Síndrome Respiratória Aguda Grave e com evolução de Coagulopatia Intravascular Disseminada, antivirais como o remdesivir têm se mostrado promissores. Neste trabalho sugerimos que a função desse fármaco na melhora da coagulopatia seria o fato de ele conseguir se ligar a fatores da cascata de coagulação humana, funcionando como um anticoagulante e melhorando o quadro e o prognóstico do paciente.

REFERÊNCIAS

ANDRICOPULO, A.; GUIDO, R.; OLIVA, G. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37-46, 1 jan. 2008.

ARENTS, M. et al. Characteristics and outcomes of 21 critically patients with COVID-19 in Washington State. **JAMA**. 2020.

BBC. Coronavírus: o mapa que mostra o alcance mundial da doença [Internet]. Brasil: **BBC**; 2020 abr. 26 Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/internacional-51718755>.

CARLO C., CARLA, E. G., GIAMPIERO N., MARTINA, M., PIO C. New pharmacological approach based on Remdesivir aerosolized administration on SARS-CoV-2 pulmonary inflammation: A possible and rational therapeutic application. **Med Hypotheses**, 24;144:109876, 2020. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109876.

CARVALHO, P. **Coronavírus: pessoas com asma, pressão alta e diabetes correm maior risco.** 2020. Disponível em: <https://www.uol.com.br/vivabem/noticias/redacao/2020/03/12/qual-o-grupo-de-risco-do-coronavirus.htm>.

GORBALENYA, A.E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nat Microbiol**. 2020 mar. 02. 5, 536–544. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.

GUO, Z. Remdesivir: From compassionate medication to phase III clinical study. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2020.

LIMA, C. M. A. O. Informações sobre o novo coronavírus (COVID-19). **Radiologia Brasileira**, v. 53, n. 2, p. V-VI, 2020.

LIU, W.; LI, H. COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism. **ChemRxiv**. 2020.

MANLI W., RUIYUAN C., LEIKE Z., XINGLOU Y., JIA L., MINGYUE X., ZHENGLI S., ZHIHONG H., WU Z., GENGFU X.: Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Nature - Cell Research** (2020) 30:269–271; <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.

MENG, E. C., SHOICHET, B. K., AND KUNTZ, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **J. Comput. Chem.** 13, 505–524, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2020. Disponível em: <https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca#diagnostico>.

OLIVEIRA, E. D. S.; MORAIS, A. C. L. N. D. COVID-19: uma pandemia que alerta à população. **Interamerican Journal Of Medicine And Health**, [S.L.], v. 3, p. 1-7, 2 abr. 2020.

OLIVEIRA, W.K. et al. How Brazil can hold back COVID-19. **Epidemiol Serv Saude**. 2020. (Epub ahead of print).

OPAS/OMS. **Folha informativa - COVID 19**. 2020. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875#contagio.

SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. Structure-Based Approach for the Study of Estrogen Receptor Binding Affinity and Subtype Selectivity. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, v. 48, n. 11, p. 2243-2253, 21 out. 2008.

SHEREEN, M.A. et al. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**. 2020 mar. 16 4:91-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>.

SHITYAKOV S, FÖRSTER C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Adv Appl Bioinform Chem**. 2014;7:23-36. Published 2014 Sep 2. doi:10.2147/AABC.S63749.

THOMAS-RÜDDEL, D. et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): update for anesthesiologists and intensivists. **Anaesthesist**, 2020.

TOSHIKI I., JERROLD L., MARCEL L., JECKO T. Coagulopathy in COVID-19, **J Thromb Haemost**, 2020 Jun 18;10.1111/jth.14975. doi: 10.1111/jth.14975. Online ahead of print.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **Jama**, v. 323, n. 13, p. 1239, 7 abr. 2020.